

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Farmacologia

Daiana Vogel

**Envolvimento das vias óxido nítrico/guanilato
ciclase solúvel e fosfatidilinositol 3-quinase/Akt no
relaxamento vascular induzido por extratos
hidroalcoólicos da casca da jabuticaba
(*Plinia peruviana*)**

Florianópolis
2015

Daiana Vogel

**Envolvimento das vias óxido nítrico/guanilato
ciclase solúvel e fosfatidilinositol 3-quinase/Akt no
relaxamento vascular induzido por extratos
hidroalcoólicos da casca da jabuticaba
(*Plinia peruviana*)**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia do
Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo da
Silva Santos

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Vogel, Daiana

Envolvimento das vias óxido nítrico/guanilato ciclase solúvel e fosfatidilinositol 3-quinase/Akt no relaxamento vascular induzido por extratos hidroalcoólicos da casca da jabuticaba (Plinia peruviana) / Daiana Vogel ; orientador, José Eduardo da Silva Santos - Florianópolis, SC, 2015.

97 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Tônus vascular. 3. Função endotelial. 4. Biologia vascular. 5. Estresse oxidativo. I. Silva Santos, José Eduardo da . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me iluminado e dado forças para desenvolver este trabalho.

A toda minha família por todo o apoio, incentivo, e pela confiança em mim depositada.

Ao meu noivo, Felipe, pelo apoio incondicional e incentivo.

Ao professor Dr. José Eduardo, pela orientação, ensinamentos, incentivos, e correções quando necessário.

Aos meus colegas e amigos de laboratório: Angélica, Rita, Karla, Priscila, Adriane, Thiago, Danillo, Elaine, Rui e Ronald, obrigada pelos ensinamentos, carinho, e apoio em todos momentos.

As minhas amigas de “cursão” e da vida, Débora e Clarissa, pelo apoio, desabafos, amizade e cumplicidade em todos os momentos.

Aos membros da banca Prof. Dr. Daniel Fernandes, Prof. Dr. Jamil Assrey, Prof. Dr. Alex Rafacho, Prof. Dra. Elizabeth Linder por aceitarem avaliar e contribuir para este trabalho.

A Prof. Dra. Rosa, Dra. Aline e ao Prof. Dr. Marcelo pelo suporte, atenção, dedicação e fornecimento dos extratos testados.

As instituições de fomento CAPES, CNPQ e FAPESC pelo auxílio financeiro.

Aos funcionários do departamento pelo auxílio prestado.

Aos animais, pois sem eles este trabalho não existiria.

E a todos que de maneira direta ou indireta colaboraram com a execução deste trabalho.

OBRIGADA!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.
(Madre Teresa de Calcuta)

RESUMO

A espécie *Plinia peruviana* é uma árvore conhecida popularmente como ‘jabuticaba de cabinho’, cujos frutos são utilizados no preparo de geleias, licores, destilados e vinhos. Este estudo teve como objetivo investigar o efeito de extratos brutos obtidos das cascas do fruto da *Plinia peruviana* sobre o tônus vascular em aorta de rato, e identificar os mecanismos de ação envolvidos neste efeito *in vitro*. Neste trabalho revelou-se que o efeito vasodilatador do extrato preparado a partir das cascas do fruto da *Plinia peruviana*, obtidos pelo método de extração assistida por micro-ondas e rotaevaporação (EBM-1) é totalmente dependente do endotélio em anéis de aorta de rato previamente contraídos por fenilefrina. Este efeito induzido pelo EBM-1 foi abolido em preparações incubadas com os inibidores das enzimas óxido nítrico sintase L-NAME, ou da guanilato ciclase ODQ, bem como sequestrador de NO carboxi-PTIO. O inibidor não seletivo de canais de K^+ ativados pelo Ca^{+2} e de canais de K^+ ativados por voltagem tetraetilamonio TEA, assim como o sequestrador de ânions superóxido tempol, reduziram o E_{max} vasorrelaxante do EBM-1 em aproximadamente 35 e 26%, respectivamente. O efeito vasodilatador do EBM-1 em anéis de aorta também foi significativamente reduzido na presença de wortmanin (um inibidor da fosfatilinositol 3-cinase (PI3K), ou do inibidor da proteína cinase B (Akt 1/2). Deste modo os resultados obtidos neste trabalho revelam que as cascas do fruto da *plinia peruviana* apresentam componentes capazes de causar relaxamento vascular *in vitro*. Este efeito é decorrente da ativação das vias do óxido nítrico/guanilato ciclase e, pelo menos em parte, da PI3K/Akt. Também parece envolver uma regulação da produção ou biodisponibilidade de espécies reativas de oxigênio, bem como da abertura de canais de K^+ ativados por voltagem. Estudos adicionais devem ser realizados para explorar a importância desses achados na regulação do tônus vascular em modelos *in vivo*, bem como o potencial de preparações obtidas a partir de extratos das cascas do fruto da jabuticaba em doenças envolvendo o sistema cardiovascular, como a hipertensão arterial sistêmica, angina e aterosclerose.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Função endotelial. Tônus vascular. Polifenóis. Biologia vascular.

ABSTRACT

Plinia peruviana is a tree popularly known as ‘jabuticaba de cabinho’. Its fruits are commercialized and used to prepare jams, liqueurs and wines. Using rat aortic rings maintained in organ baths for experimentation, this study discloses the endothelium-dependent vasodilatory effect induced by a crude hydroalcoholic extract prepared using the fruit peel’s of *Plinia peruviana*, which was obtained by microwave-assisted extraction method followed by rotavap (EBM-1). The ability of EBM-1 to induce vasodilation was abolished by L-NAME (a nitric oxide synthase inhibitor), ODQ (a guanylyl cyclase inhibitor), as well as by the NO scavenger carboxy-PTIO. The non-selective blocker of the Ca^{+2} -activated and voltage dependent K^{+} channels, tetraethylammonium (TEA), and the superoxide anion scavenger tempol, reduced the maximum relaxation elicited by EBM-1 by around 35% and 25%, respectively. In addition, wortmannin (a phosphoinositide 3-kinase inhibitor) reduced EBM-1-induced relaxation in aortic rings by 75%. The incubation of preparations with the protein kinase B inhibitor (Akt1/2) also impaired the relaxation generated by EBM-1. On the other hand, the mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor, rapamycin, as well dorsomorphin (an inhibitor of adenosine monophosphate activated protein kinase; AMPK) did not alter the vascular relaxation induced by EBM-1. Taken together, our results show that the fruits peel of *Plinia peruviana* presents one or more compounds able to induced *in vitro* vascular relaxation. This effect depends on activation of the nitric oxide/guanylate cyclase pathway in endothelial cells, and seems to involve the regulation of production or bioavailability of reactive oxygen species, such as superoxide, as well the opening of Ca^{+2} -activated and voltage dependent K^{+} channels. In addition, our data also reveals that activation of PI3K plays a major role in this effect, at least in part through protein kinase B (Akt) enzymes. Further studies, including *in vivo* approaches, must be carried out for a better comprehension of the effects of preparations obtained from “jabuticaba” peel on the cardiovascular system, in both physiological and pathological conditions.

Keywords: Oxidative stress. Endothelial function. Vascular tone. Polyphenols. Vascular biology.

LISTA DE ABREVIACÕES

Akt	Proteína cinase B
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
AMPK	Proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina
ATP	Adenosina tri-fosfato
BH ₄	Tetrahydrobiopterina
CCR	Curvas de respostas dependentes da concentração
COX	Ciclooxigenase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA-PK	Proteína cinase dependente de DNA
EBHUP	Extrato bruto hidroalcólico obtido por ultrapressão
EBHUS	Extrato bruto hidroalcólico obtido por ultrassom
EBM	Extrato bruto obtido por micro-ondas
EDHF	Fatores hiperpolarizantes derivados do endotelio
EET	Ácido epoxi eicosatrienóicos
E _{max}	Efeito máximo
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERK	Cinase regulada por sinais extracelulares
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GTN	Gliceriltrinitrato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ S	Sufeto de hidrogênio
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular- 1
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IRS	Substrato receptor de insulina
K _{Ca}	Canais de K ⁺ ativados pelo cálcio
KCl	Cloreto de potássio
K _{ir}	Canais de K ⁺ retificadores de influxo
K _{ir} 6.x	Canais de K ⁺ sensíveis ao ATP
K _v	Canais de K ⁺ ativados por voltagem
L-NAME	Nw-nitro-L-arginina metil éster
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MLC	Cadeia leve de miosina
MLCK	Cinase de cadeia leve de miosina
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
mTORC1	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos complexo 1

mTORC2	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos complexo 2
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NO _x	Enzima NADPH oxidase
O ₂	Oxigênio molecular
ODQ	1H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-a]-quinoxalin-1
OH [•]	Radical hidroxila
PAI-1	Inibidor do ativador do plasmogênio I
PDK-1	Proteína cinase dependente de fosfatidilinosítide-3
PGI ₂	Prostaciclina
PHLPP1/2	Proteína fosfatase rica em repetições leucina e domínios PH
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinase
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5trifosfato
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PP2A	Proteína fosfatase 2 ^a
PRAS40	Substrato rico em prol
PtdIns4P	Fosfatidilinositol-4fosfato
PTEN	Fosfatase homóloga a tensina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RTK	Receptor tirosina cinase
SMC	Célula muscular lisa
STAT ₃	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TEA	Tetraetilamônio
t-PA	Ativador do plasminogênio tecidual
TSC	Complexo da esclerose tuberosa
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1
vWF	Fator de von willebrand

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da formação de NO por meio da NOS.	29
Figura 2: Jabuticaba (Plinia peruviana)- árvore e fruto.....	42
Figura 3: Relaxamento vascular dependente do endotélio induzido pelos extratos EBM-1 e EBM-2, obtidos a partir das cascas do fruto da Plinia peruviana.....	56
Figura 4: Comparação da potência vasorrelaxante do extrato EBM-1 (rotaevaporado) e EBM-2 (não rotaevaporado) em aortas de ratos.....	56
Figura 5: Papel da óxido nítrico sintase e do óxido nítrico no relaxamento induzido pelo EBM-1 em anéis de aorta de rato.....	58
Figura 6: Envolvimento da enzima guanilato ciclase solúvel no relaxamento induzido pelo EBM-1 em anéis de aorta de rato.....	59
Figura 7: Inibição da ciclooxigenase (COX) não altera o relaxamento induzido pelo EBM-1	60
Figura 8: Antagonistas de receptores histamínicos e muscarínicos não alteram o relaxamento induzido pelo EBM-1	61
Figura 9: Efeito relaxante induzido pelo EBM-1 na presença de inibidores de canais de potássio ativados por cálcio	62
Figura 10: Efeito relaxante induzido pelo EBM-1 na presença de inibidores seletivos de canais de potássio sensíveis ao ATP ou ativados por voltagem.....	63
Figura 11: Participação de ROS na vasodilatação induzida pelo EBM-1.....	64
Figura 12: Participação da via PI3K/Akt no vasorrelaxamento induzido pelo EBM-1 em anéis de aorta de rato	65
Figura 13: Inibidores da AMPK e mTOR não alteram o relaxamento em resposta ao EBM-1.	66
Figura 14: Avaliação do efeito vasorrelaxante de diferentes extratos obtidos das cascas do fruto da Plinia peruviana	67
Figura 15: Eventos potencialmente envolvidos no relaxamento vascular de anéis de aorta de rato induzido pelo EBM-1.	75

LISTA DE TABELAS

1. Métodos de extração, efeito máximo relaxante (E_{\max}) e concentração efetiva 50% (CE_{50}).....	68
---	----

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	25
1.1A importância do endotélio vascular no sistema cardiovascular e o controle da pressão arterial	25
1.2Óxido nítrico (NO).....	27
1.3Canais de potássio.....	31
1.4As espécies reativas de oxigênio (ROS) e o sistema cardiovascular ..	33
1.5A via fosfatidil inositol 3 cinase (PI3K)/proteína cinase B (Akt) com foco no sistema vascular	36
1.6A proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK)..	39
1.7Plantas medicinais: <i>Plinia peruviana</i>	40
2.OBJETIVOS	43
2.1Objetivo geral.....	43
2.2Objetivos específicos	43
3.MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1Material botânico	45
3.2Obtenção e caracterização dos extratos de <i>Plinia peruviana</i>	45
3.2.1 Extração assistida por micro-ondas.....	46
3.2.2 Extração assistida por ultrapressão	46
3.2.3 Extração assistida por ultrassom.....	46
3.3Animais.....	47
3.4Drogas e reagentes	47
3.5Reatividade vascular de anéis de aorta em sistema de órgão isolado	47
3.6Protocolos experimentais	49
3.6.1 Estudo da participação do endotélio vascular no relaxamento pelo EBM-1 e EBM-2	49
3.6.2 Análise da participação da via do óxido nítrico e guanilato ciclase solúvel no efeito vasorrelaxante do EBM-1 em anéis de aorta	49
3.6.3 Estudo do envolvimento da via das PGI ₂ no efeito vasorrelaxante	50

3.6.4	Investigação da participação dos receptores histamínicos e muscarínicos no relaxamento de anéis de aorta.....	50
3.6.5	Avaliação da contribuição dos canais de K^+ no relaxamento de anéis de aorta induzido pelo EBM-1.....	50
3.6.6	Determinação da influência do estresse oxidativo no efeito relaxante ocasionado pelo EBM-1.....	51
3.6.7	Estudo da participação da via PI3K/Akt/mTOR e AMPK no relaxamento de anéis de aorta à EBM-1	51
3.6.8	Avaliação dos diferentes métodos de extração sobre o efeito vasorrelaxante dos extratos de <i>Plinia peruviana</i>	52
3.7	Análise estatística.....	52
3.8	Drogas e reagentes	52
4	RESULTADOS.....	55
4.1	Influência do endotélio vascular no relaxamento pelo EBM-1 e EBM-2	55
4.2	Participação da via do NO e GMPc no efeito vasodilatador do EBM-1	57
4.3	Ausência de envolvimento de prostanóides e de receptores histamínicos e muscarínicos no efeito vasorelaxante do EBM-1	60
4.4	Contribuição de canais de K^+ no vasorrelaxamento de anéis de aorta induzido pelo EBM-1.....	61
4.5	Participação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no efeito vasodilatador do EBM-1	63
4.6	Participação da via PI3K/Akt/mTOR e da AMPK no relaxamento induzido pelo EBM-1 em anéis de aorta de rato	64
4.7	Avaliação de diferentes métodos de extração sobre o efeito vasorrelaxante.....	66
5	DISCUSSÃO	69
6	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS.....	79

APÊNDICE A91

ANEXO A93

ANEXO B95

ANEXO C97

1. INTRODUÇÃO

1.1 A importância do endotélio vascular no sistema cardiovascular e o controle da pressão arterial

Os vasos sanguíneos possuem papel importante na manutenção da pressão arterial. Por exemplo, o aumento na resistência arterial periférica eleva a pressão arterial e leva ao desenvolvimento da hipertensão arterial sistêmica tanto em modelos experimentais como em humanos (Zicha *et al.*, 2014). Até o momento, há um total de 69 fármacos aprovadas nos Estados Unidos para o tratamento da hipertensão, sendo que boa parte delas atua de maneira direta ou indireta nos vasos, buscando restaurar os níveis pressóricos normais. Embora exista um número elevado de fármacos diferentes, cerca de 10 a 15% da população de hipertensos não responde de maneira adequada ao tratamento (Oparil *et al.*, 2015). Os riscos e complicações associadas à hipertensão não controlada apontam para a importância de estudos que visem a descoberta de novos fármacos e alvos terapêuticos para o tratamento dessa doença.

É importante ressaltar que os vasos sanguíneos são formados por três camadas histológicas: a camada externa ou adventícia formada de tecido conjuntivo, a camada média formada por células musculares lisas (Battle *et al.*, 1994), e a camada íntima formada por uma única camada de células endoteliais (Kooiman *et al.*, 2013), a qual possui um papel essencial na manutenção do tônus vascular. De fato, alterações em fatores derivados do endotélio, em especial o óxido nítrico, estão implicados na hipertensão arterial (Bragulat *et al.*, 2001). As células endoteliais, além de formarem uma barreira de permeabilidade entre o sangue e a parede vascular, participam do controle de diversas funções importantes para os vasos, como a regulação da migração celular, o remodelamento vascular, o metabolismo de mediadores químicos, e a regulação da contratilidade das células do músculo liso vascular (SMCs). É interessante destacar que as células endoteliais são moduladas por ligantes químicos hormonais e fatores mecânicos, como a tensão de cisalhamento exercida pelo fluxo sanguíneo nos vasos. Por exemplo, a aplicação de tensão de cisalhamento nas células endoteliais pode ativar uma série de mecano-sensores, dentre os quais incluem-se proteínas de membrana como receptores tirosina cinase, integrinas, vias de transdução associadas a receptores acoplados a proteína G (GPCR), canais de Ca^{2+} , e proteínas de junção intracelulares (Chien, 2007).

A importância do endotélio vascular foi conhecida primeiramente pelos seus efeitos no tônus vascular. Isto se deve à ação de diversos mediadores vasoativos, como por exemplo a bradicinina e a trombina. Experimentos pioneiros de Furchgott e Zawadzki (1980) mostraram a existência de um fator relaxante derivado do endotélio, posteriormente caracterizado como sendo o óxido nítrico (NO). O NO, gerado nas células endoteliais a partir da L-arginina através da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), na presença de cofatores como a tetrahidrobiopterina (BH₄), é um gás que se difunde pelo músculo liso vascular e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), levando à vasodilatação mediada pelo monofosfato cíclico de guanosina (GMP cíclico) (Deanfield *et al.*, 2007). Abordaremos de modo mais aprofundado a formação do óxido nítrico e vias de sinalização no item 1.2.

Outros mediadores, como as espécies reativas de oxigênio (ROS) também são produzidos nas células endoteliais e possuem funções fisiológicas em células endoteliais saudáveis. Por exemplo, ROS desencadeiam cascatas de sinalização que atuam em processos como na proliferação celular e a expressão gênica (Moldovan *et al.*, 2006). Além disso, ROS modulam a atividade sinalizadora de proteínas, enzimas e canais iônicos nas células endoteliais. O peróxido de hidrogênio, por exemplo, modula a sobrevivência, o crescimento e a proliferação celular, e a reorganização de citoesqueleto, além de possuir efeito vasorrelaxante (Bretón-Romero *et al.*, 2014) (maiores detalhes no item 1.4).

A prostaciclina (PGI₂), outra substância produzida nas células endoteliais e que também regula o tônus vascular, é gerada pela ação da enzima ciclooxigenase (COX) sobre o ácido araquidônico. Uma vez produzida, a PGI₂ atravessa o espaço intercelular e ativa, principalmente, receptores do tipo IP₁, estimulando a proteína G acoplada a este receptor na membrana celular (Nakagawa *et al.*, 1994). A proteína G, por sua vez, estimula a enzima adenilato ciclase promovendo o aumento de AMPc. O AMPc ativa a proteína cinase A (PKA), a qual, dentre outros efeitos, reduz a atividade da cinase de cadeia leve de miosina (MLCK), diminuindo a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC) e promovendo o relaxamento vascular (Birukova *et al.*, 2007). Além deste mecanismo, a PGI₂ também pode atuar na abertura de canais de potássio, um efeito que é mais proeminente em vasos de menor calibre como por exemplo as artérias coronárias. Nesses vasos, as prostaciclinas atuam como fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHFs) (Edwards *et al.*, 2010).

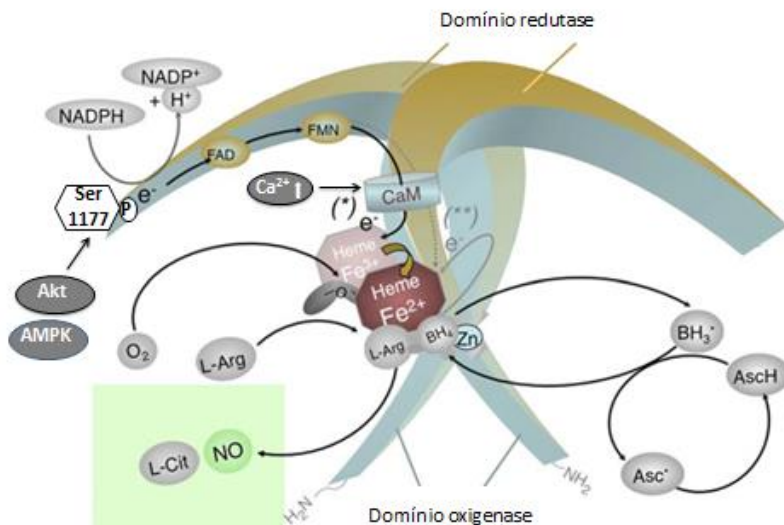
Os EDHFs promovem vasodilatação através da hiperpolarização das células musculares lisas vasculares por meio da estimulação de canais de K^+ ou de proteínas Na^+/K^+ -ATPase, dentre outros. Vários EDHFs são descritos pela literatura científica, incluindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o monóxido de carbono (CO), o sulfeto de hidrogênio (H_2S), a anandamida, e íons K^+ (Durand *et al.*, 2013). Além desses, fatores derivados do citocromo P450 2C como os ácidos epoxi eicosatrienoicos (EETs) (Ozkor *et al.*, 2011), e o peptídeo natriurético C (Garland *et al.*, 2008) também são descritos como EDHFs, e parecem ter um papel importante na compensação da perda do tônus vasodilatador mediado pelo NO, principalmente na microcirculação, por exemplo quando a biodisponibilidade de NO está reduzida. Contudo, no endotélio não ocorre somente a formação de substâncias vasodilatadoras, mas também de mediadores vasoconstritores como a endotelina e outros prostanóides. Além disso, o endotélio vascular contribui para a formação do vasoconstritor angiotensina II. Estes agentes vasoconstritores atuam localmente, em sua maioria, mas podem exercer alguns efeitos sistêmicos, além de possuírem ação importante na regulação da estrutura arterial e remodelamento (Deanfield *et al.*, 2007).

1.2 Óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico é uma molécula mensageira que possui vários alvos moleculares. O NO controla funções como a neurotransmissão, tônus vascular e regula a transcrição gênica (Forstermann *et al.*, 2012). O NO pode ser gerado por três diferentes isoformas da enzima NO sintase: neuronal (nNOS) ou NOS I, induzida (iNOS) ou NOS II, e endotelial (eNOS) ou NOS III. Todas as isoformas de NOS utilizam L-arginina como substrato, oxigênio molecular e NADPH como co-substratos, e flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e BH_4 como cofatores. Todas as NO sintases também têm a atividade dependente do complexo cálcio-calmodulina (Forstermann *et al.*, 2006).

As NOS são homodímeros que se ligam aos diferentes cofatores, os quais são necessários para converter L-arginina e O_2 em L-citrulina e NO. Cada monômero é formado por um domínio redutase e um domínio oxigenase. O domínio oxigenase está localizado na região N-terminal e contém BH_4 , ferro heme, e sítios de ligação da L-arginina. O agrupamento heme é essencial para que ocorra a dimerização, assim como a L-arginina e BH_4 , pois atuam como estabilizadores da forma dimérica ativa. Além disso, a estabilização gerada pelo tiolato de zinco

(ZnS₄) ocorre pela formação de um cluster entre dois resíduos cisteína de cada monômero, por meio do íon zinco. Este aglomerado é responsável pela integridade do sítio de ligação de BH₄. A parte C-terminal é um domínio redutase com sítios para duas flavinas, FAD e FMN, e nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio (NADPH). Ocorre a produção de elétrons pela oxidação de NADPH para NADP⁺ no domínio flavina de cada monômero. Estes elétrons são transferidos, um de cada vez, para o domínio oxigenase, onde acontece a redução do oxigênio molecular (O₂) para O₂⁻, o qual ligada-se à L-arginina e é convertido a NO e ao produto L-citrulina. A oxigenase está ligada ao domínio redutase através de um domínio de ligação inibitório sensível à calmodulina. Para ser ativada, a eNOS deve ser desinibida por meio da ligação de duas calmodulinas ativadas pelo cálcio, que assegura a transferência de elétrons da redutase para o domínio oxigenasse (Figura 1) (Forstermann e Munzel, 2006; Gielis *et al.*, 2011)



Adaptado de: Forstermann, 2010

Figura 1: Esquema da formação de NO por meio da NOS. De maneira resumida a ativação da NOS ocorre por meio da transferência de elétrons do domínio redutase de um monômero para o domínio oxigenase do outro monômero, com a utilização L-arginina como substrato, oxigênio molecular e NADPH como co-substratos, e FAD, FMN e BH₄ como cofatores para a produção de NO. Akt= Proteína cinase B; AMPK= Proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina; Asc= radical ascorbato; AscH= Ácido ascórbico; BH₄=Tetrahidrobiopterina; BH₃= Radical trihidrobiopterina; CaM= Calmodulina; FAD= Flavina adenina; dinucleotídeo; FMN= Flavina mononucleotídeo; L-Arg= L-Arginina; NADPH= Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio; NO= Óxido nítrico ZN= Zinco tiolato.

Quando o equilíbrio entre a quantidade de cofator BH₄ e a expressão da enzima eNOS é rompido ocorre o desacoplamento desta enzima. Nessa condição, a eNOS na sua forma monomérica produz ânions superóxido (O₂⁻) ao invés de óxido nítrico. O O₂⁻ é um radical livre de meia vida curta, que pode não apenas reagir rapidamente com o NO para formar peroxinitrito (ONOO⁻) e reduzir a biodisponibilidade de NO, mas também ser degradado pela enzima superóxido dismutase (SOD) formando peróxido de hidrogênio. Por sua vez, tanto o peroxinitrito como o ânion O₂⁻ podem oxidar o BH₄ formando BH₂, o

que pode exacerbar o desacoplamento da eNOS, mantendo uma condição de redução da formação e biodisponibilidade de NO (Durand e Gutterman, 2013). Outros mecanismos também podem culminar no desacoplamento da eNOS, os quais incluem depleção de L-arginina, acumulação de metilargininas endógenas e a S-glutathionilação da eNOS (Forstermann e Sessa, 2012).

A óxido nítrico sintase endotelial está expressa principalmente em células endoteliais. Entretanto, a eNOS também foi detectada em cardiomiócitos, plaquetas, certos neurônios do cérebro, em sinciciotrofoblasto¹ de placenta humana e em células tubulares epiteliais renais LLC-PK1. A eNOS sintetiza NO de modo pulsátil, e sua atividade é aumentada acentuadamente quando os níveis de Ca^{2+} intracelular no citoplasma se elevam. O Ca^{2+} induz a ligação da calmodulina à enzima, cujo papel na ativação da enzima foi descrito anteriormente. Entretanto, muitas outras proteínas podem interagir com a eNOS e regular a sua atividade. Por exemplo, a proteína do choque térmico (hsp90) foi encontrada associada à eNOS e atua como modulador alostérico, ativando a enzima e promovendo o re-acoplamento da eNOS. A porção da eNOS que se localiza nas cavéolas pode interagir com a proteína de revestimento caveolar, caveolina-1. A caveolina-1 é um inibidor tônico da atividade da eNOS (Forstermann e Sessa, 2012). Outras proteínas cinases também estão envolvidas na ativação da NOS endotelial, como a proteína cinase B (Akt) e a proteína cinase ativada por AMP (AMPK). Schleider e colaboradores (2009), demonstraram que *in vivo*, a eNOS é um substrato predominante da Akt, tendo papel fundamental na angiogênese mediada por essa via. Essa participação ocorre a partir da fosforilação da eNOS em seus resíduos Ser1177 pela Akt (Figura 1), o que leva ao aumento na produção de NO, que contribui para a revascularização e preservação do fluxo sanguíneo (Schleicher *et al.*, 2009)

Como abordado anteriormente, o óxido nítrico sintetizado pela NOS difunde-se das células endoteliais para o músculo liso vascular, onde estimula a enzima GCs através da ligação ao grupamento heme. A ativação da GCs gera um aumento na concentração de GMPc. O GMPc promove o relaxamento do músculo liso vascular por meio da redução da concentração do cálcio intracelular e dessensibilização do aparato

¹ Sinciciotrofoblastos constituem a última camada entre o tecido materno e o tecido fetal. Esta camada é importante para a troca materno-fetal, remodelamento de tecidos durante o desenvolvimento da placenta, e para proteger o feto em desenvolvimento da resposta imunitária materna (Mi *et al.*, 2000)

contrátil ao cálcio. Esta redução no cálcio intracelular ocorre pela inibição do influxo de Ca^{2+} por meio de canais de cálcio tipo-L² e aumento do efluxo de cálcio pela Ca^{2+} -ATPase e pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. O GMPc também pode produzir hiperpolarização da membrana através da ativação da Na^+/K^+ ATPase. Além disso, o GMPc pode ativar a fosfatase de cadeia leve de miosina, resultando em defosforilação da cadeia leve de miosina e consequente relaxamento vascular (Lucas *et al.*, 2000).

Além destas vias, o NO pode promover o relaxamento vascular através da hiperpolarização ou repolarização das células do músculo liso por meio da ativação de canais de K^+ como canais de K^+ sensível ao ATP ($\text{K}_{\text{ir}6.x}$), canais de K^+ de alta condutância ativados pelo Ca^{2+} ($\text{K}_{\text{Ca}1.x}$, $\text{K}_{\text{Ca}4.x}$, $\text{K}_{\text{Ca}5.x}$), canais de K^+ retificadores de influxo ($\text{K}_{\text{ir}2.x}$ ou $\text{K}_{\text{ir}3.x}$) e/ou canais de K^+ ativados por voltagem (K_v). Além disso, o NO interage com outros canais iônicos do músculo liso, incluindo canais catiônicos e de cloreto e ainda influência o potencial de membrana de células do músculo liso indiretamente de modo autócrino (Feletou *et al.*, 2006).

1.3 Canais de potássio

Depois das proteínas cinases e receptores acoplados a proteína G, os canais iônicos ativados por voltagem (VGICs) constituem o terceiro maior grupo de moléculas sinalizadoras codificadas pelo genoma humano. Com 78 membros, os canais de K^+ compõem cerca da metade da extensão de genes desta superfamília (Wulff *et al.*, 2009). Estes canais são proteínas transmembrana que possuem uma ação importante em diversos processos fisiológicos, incluindo tônus vascular, repolarização cardíaca, liberação de neurotransmissores, secreção hormonal, e excitabilidade celular (Sandhiya *et al.*, 2009). São formados por subunidades α , as quais determinam a estrutura do canal, e subunidades auxiliares β , que podem modificar as propriedades do canal (Tian *et al.*, 2014). Quatro tipos principais de canais de K^+ estão descritos no músculo liso vascular: K_v ou ativados por voltagem, $\text{K}_{\text{ir}6.x}$ sensíveis ao ATP, $\text{K}_{\text{ir}2.x}$ e $\text{K}_{\text{ir}3.x}$ retificadores de influxo e $\text{K}_{\text{Ca}1.x}$, $\text{K}_{\text{Ca}4.x}$, $\text{K}_{\text{Ca}5.x}$ de alta condutância ativados pelo cálcio, sendo que os dois principais canais expressos no músculo liso vascular são os K_v e

² Canais de cálcio tipo-L ou canais $\text{Ca}_v1.x$ segundo a normalização adotada pela IUPHAR em conjunto com o guia conciso para farmacologia 2013/2014 (Alexander *et al.*, 2013).

K_{Ca} de condutância alta (Nelson *et al.*, 1995; Carvalho-De-Souza *et al.*, 2013).

A história dos canais de K^+ ativados pelo Ca^{2+} é da década de 1970, quando Meech relatou pela primeira vez, em 1972, que injeções intracelulares de Ca^{2+} induziam um aumento na condutância de K^+ em células nervosas. Posteriormente, foram descritos e classificados de acordo com condutância unitária como canais de: condutância alta ($K_{Ca1.x,4.x,5.x}$), condutância intermediária ($K_{Ca3.x}$), e condutância baixa ($K_{Ca2.x}$) (Sah *et al.*, 2002). Os K_{Ca} de condutância alta encontram-se expressos preferencialmente no músculo liso vascular, enquanto que K_{Ca} de condutância intermediária e K_{Ca} de condutância baixa estão localizados principalmente em células endoteliais (Feletou, 2009). A abertura de canais K_{Ca} de alta condutância é determinada pela voltagem da membrana, concentração intracelular de Ca^{2+} , ou pela concentração intracelular de Mg^{2+} (Shi *et al.*, 2002). Além disso, os canais K_{Ca} de condutância alta também sofrem a ação de substâncias vasoativas que atuam ativando esses canais, como o GMPc e o próprio NO, ou inibindo-os, como a angiotensina II, a endotelina 1 e a proteína cinase C (PKC). No sistema vascular, os canais K_{Ca} de condutância alta são considerados fundamentais para a manutenção do tônus vasomotor normal por meio da sua atuação na regulação de mecanismos acoplados à contração ou excitação. Nas células musculares lisas, a ativação dos K_{Ca} de condutância alta promove uma repolarização rápida da membrana e consequentemente leva a inativação de canais de Ca^{2+} ativados por voltagem, resultando numa diminuição da entrada de Ca^{2+} e aumento do efluxo de Ca^{2+} pelo trocador Na^+-Ca^{2+} , e consequentemente, no relaxamento do músculo liso (Carvalho-De-Souza *et al.*, 2013). Uma droga amplamente utilizada para caracterização da participação de canais de K_{Ca} de condutância elevada é a iberiotoxina, uma toxina isolada do veneno de escorpião, que apresenta seletividade para estes canais (Sandhiya e Dkhar, 2009; Edwards *et al.*, 2010; Ozkor e Quyyumi, 2011).

Os canais K_{ir} possuem diversas funções fisiológicas dependendo do tipo e localização. Esses canais regulam a excitabilidade da membrana e são encontrados em células como cardiomiócitos, neurônios, endoteliais e epiteliais. Os K_{ir} permitem que o K^+ se mova mais facilmente para dentro do que para fora da célula. São divididos em sete subfamílias que podem ser classificadas em quatro grupos funcionais: canais K_{ir} ($K_{ir2.x}$), os quais são chamados de canais clássicos, canais K_{ir} ligados a proteína G ($K_{ir3.x}$), canais de K^+ sensíveis

ao ATP ($K_{ir6.x}$) (Bichet *et al.*, 2003), e canais de K^+ de transporte ($K_{ir1.x}$, $K_{ir4.x}$, $K_{ir5.x}$, e $K_{ir7.x}$). (Hibino *et al.*, 2010).

Os canais de K^+ sensíveis ao ATP são octômeros formados por 4 subunidades $K_{ir6.x}$, o qual forma o poro do canal iônico, e quatro proteínas auxiliares, os receptores de sulfuniluréias ($SURx$). São conhecidos diversos agentes farmacológicos que inibem os $K_{ir6.x}$ por meio da ligação à porção SUR , como clorpropamida, tolbutamida e glibenclamida, esta última usada no tratamento do diabetes tipo 2 (Hibino *et al.*, 2010). Os canais de $K_{ir6.x}$ no sistema vascular podem ser ativados por substâncias vasodilatadoras como a adenosina, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, prostaciclina, e agonistas de receptores β -adrenérgicos, o que foi evidenciado em preparações de músculo liso vascular estudadas *in vitro*, e ocorre por meio da ativação da proteína cinase dependente de AMPc (PKA). A PKA fosforila os $K_{ir6.1}$ e 6.2 em diferentes sítios Ser/Thr, contribuindo para a hiperpolarização da membrana celular e redução do influxo de cálcio, desta forma diminuindo a contratilidade vascular (Akrouh *et al.*, 2009).

No genoma humano são codificados 40 canais K_v , os quais estão envolvidos em processos fisiológicos, que vão desde a repolarização de neurônios e potenciais de ação cardíacos, até a regulação da sinalização do Ca^{2+} , volume celular, proliferação e migração celular. Estes canais, são divididos em 12 subfamílias. Dentre elas encontram-se os $K_v1.4$, $K_v1.5$, $K_v1.6$, $K_v4.3$, que estão expressos em células do músculo liso, e os $K_v7.4$, $K_v7.5$, expressos em células do músculo liso vascular (Wulff *et al.*, 2009).

No músculo liso os canais K_v são ativados pela despolarização da membrana, permitem o efluxo de K^+ e contribuem, em parte, com a repolarização da membrana e para o retorno do potencial para o estado de repouso. Desta forma, a ativação dos K_v limita a despolarização e mantém o tônus vascular. Uma pequena despolarização nas células musculares lisas vasculares ativa os canais de Ca^{2+} tipo-L ativados por voltagem, causando o influxo de Ca^{2+} e estimulação de filamentos contráteis (Ko *et al.*, 2010). Assim, uma diminuição da função de canais K_v nas células musculares lisas de vasos está associada a patologias como hipertensão, diabetes e isquemia de reperfusão (Ko *et al.*, 2008).

1.4 As espécies reativas de oxigênio (ROS) e o sistema cardiovascular

As ROS são moléculas sinalizadoras importantes em vários processos fisiológicos, como defesa, envelhecimento e homeostase.

Pesquisas recentes mostram que as vias de sinalização das ROS são complexas, compartimentalizadas, e em vários casos, essenciais para a fisiologia cardiovascular. As ROS incluem superóxido, peroxinitrito, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (HO^\bullet), que são produzidos em sistemas biológicos. O_2^- e H_2O_2 são produzidos enzimaticamente e estão envolvidos em sinalizações fisiológicas e patológicas associadas ao estresse oxidativo. Outras ROS, como OONO^- e HO^\bullet , são consideradas moléculas sinalizadoras devido à natureza altamente reativa, e também contribuem para o estresse oxidativo e para danos teciduais em doenças (Montezano *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 2015).

Entre os sistemas enzimáticos que podem potencializar a produção de ROS nas paredes dos vasos estão as NADPH oxidases, xantina oxidases, enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e a eNOS desacoplada, esta última abordada anteriormente. Destas, a NADPH oxidase (Nox) possui importância fundamental na geração de ROS (Forstermann e Sessa, 2012). As Nox estão distribuídas em diferentes organelas ou compartimentos celulares, como membranas celulares, peroxissomas e retículo endoplasmático (Saya, 2015). A família Nox é composta por 7 membros, Nox 1-5 e Duox $\frac{1}{2}$, sendo que somente as isoformas Nox1, Nox2, Nox4 e Nox5 estão presentes nos tecidos cardiovasculares. As Nox produzem principalmente O_2^- por meio de uma única redução de elétron, embora, a Nox4 também produza H_2O_2 . Apesar das enzimas Nox estarem associadas ao estresse oxidativo e doenças cardiovasculares quando hiperativas ou reguladas positivamente, a sinalização da Nox é essencial para a fisiologia normal (Sugamura *et al.*, 2011). A maior parte do O_2 gerado formará H_2O_2 de forma espontânea ou catalisada pela SOD (Brandes *et al.*, 2014). O H_2O_2 é permeável livremente e entra nas células do músculo liso. Há uma variedade de vias que podem explicar a dilatação induzida H_2O_2 , as quais incluem a ativação da PI3K, NOS, canais Kv, guanilato ciclase ou por meio da ativação de canais K_{Ca} de condutância alta através da PKG ou de maneira direta (Durand e Gutterman, 2013).

Outro exemplo de sinalização desencadeada pela regulação redox é a influenciar em múltiplos níveis na sinalização da PI3K. A proteína cinase Src, cuja reação de redução promove sua ativação, pode ativar a PI3K e desencadear a cascata sinalizadora. Além disso, a fosfatase lipídica PTEN também sofre influência da sensibilização redox, pois é inativada por oxidação tiol e desta forma deixa de interromper a transdução do sinal da PI3K (Brandes *et al.*, 2014). A sensibilização redox Src/PI3K/Akt e MAPKs também podem ativar a eNOS em células

endoteliais. Esta via redox pode ser sensibilizada em resposta a ativadores fisiológicos como a tensão de cisalhamento, estrogênios ou a produtos naturais como o ácido graxo ômega-3, catequinas do chá ou polifenóis derivados da uva (Zgheer *et al.*, 2014).

Dentre as ROS, o ânion peroxinitrito é uma espécie oxidante de meia vida curta que, como mencionado anteriormente, é produzido pela reação do óxido nítrico com radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Devido a esta origem, os sítios de formação de peroxinitrito estão espacialmente associados com fontes de superóxido, como a NADPH oxidase da membrana plasmática ou a complexo respiratório mitocondrial (Szabo *et al.*, 2007). O peroxinitrito é um oxidante potente que pode atravessar canais de ânions presentes nas membranas celulares, embora não seja esperado que atravessem livremente do meio intra para o extracelular, ao menos em parte devido à sua alta reatividade, limitando os seus efeitos a ações parácrinas (Brown e Griendling, 2015).

O peroxinitrito é capaz de afetar diversas vias de transdução, em especial aquelas que, sob condições fisiológicas, são reguladas por fosforilação ou desfosforilação. Nestas vias, o peroxinitrito causa nitração de resíduos tirosina, desta forma bloqueando as respectivas cascatas de sinalização. Esta diminuição da sinalização devido à ação do peroxinitrito já foi demonstrada em vias como as que envolvem proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT3), cinase regulada por sinais extracelulares (ERK) e PKC (Weidinger *et al.*, 2015). Sob condições fisiológicas, a produção de peroxinitrito é baixa e os danos oxidativos são minimizados por defesas antioxidantes endógenas. No entanto, quando este equilíbrio é rompido e há um aumento na produção de superóxido e óxido nítrico, aumentam também as concentrações de peroxinitrito. Se esta condição se mantiver, pode ocorrer aumento da oxidação e destruição de constituintes celulares, levando a disfunções em processos celulares essenciais, interrupção de vias de sinalização celulares, e indução da morte celular através da apoptose e necrose (Pacher *et al.*, 2007). Um dos principais efeitos em decorrência da formação do peroxinitrito é a diminuição da biodisponibilidade de NO, cuja redução está associada a doenças cardiovasculares (Forstermann e Sessa, 2012).

1.5 A via fosfatidil inositol 3 cinase (PI3K)/proteína cinase B (Akt) com foco no sistema vascular

A identificação da via associada à PI3K começou no início dos anos de 1980 através de tentativas vigorosas de caracterizar a sinalização do receptor de insulina. Este início culminou com a identificação de participantes da transdução do sinal como o substrato receptor de insulina (IRS), as proteínas cinases PI3K, Akt e a proteína cinase dependente de fosfoinositídeo-3 (PDK-1) (Hemmings *et al.*, 2012).

Até o momento, são conhecidas cerca de 8 isoformas de PI3Ks, as quais estão divididas em três classes de acordo com suas características estruturais e especificidade por substrato (Budzyn *et al.*, 2005). Sendo que os inibidores da PI3K LY294002 e wortmanin atuam em todas as isoformas desta cinase com potência similar, porém a PI3K-C2 α exibe menor sensibilidade a ambos inibidores (Domin *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 2000).

As PI3Ks de classe I são subdividas em classe IA e IB. A classe IA é formada por heterodímeros que possuem uma subunidade catalítica p110 (isoformas α , β e δ) e uma subunidade regulatória, a p85. Já as PI3Ks de classe II também são heterodímeros com subunidade catalítica p110 (isoforma γ) porém com subunidade regulatória p101 ou p87 (Osaki *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Katz *et al.*, 2007; Thorpe *et al.*, 2015). Outra diferença entre estas duas classes é que a classe IA pode ser ativada por receptores tirosina cinases (RTKs), GPCRs e certos oncôgenes como as pequenas proteínas Ras, enquanto as enzimas de classe IB são reguladas exclusivamente por GPCRs. Estudos prévios têm identificado a Akt como um efetor importante na cascata de sinalização das PI3Ks de classe I (Wang *et al.*, 2006).

As PI3Ks de classe II possuem uma única subunidade catalítica, que usa preferencialmente fosfatidilinositol ou fosfatidilinositol-4-fosfato (PtdIns4P) como substrato. Estão divididas em três subclasses: PI3K-C2 α , - C2 β e - C2 γ , onde todas podem ser ativadas pelos RTKs, receptores de citocinas e integrinas (Engelman *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009). O papel fisiológico das PI3Ks de classe II ainda não está completamente entendido, porém há evidências da sua participação na angiogênese, crescimento celular e sobrevivência (Thorpe *et al.*, 2015). A classe III das PI3Ks é formada por um único membro, o VPS34, o qual forma um heterodímero com o VPS15 associado à membrana, para então fosforilar o fosfatidilinositol e formar o fosfatidilinositol-3-fosfato (PtdIns3P). Na forma de dímero, o VPS34 é encontrado em

diferentes complexos multiproteicos, e sua atividade tem sido descrita como um importante regulador de autofagia e fagocitose. (Engelman *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009; Thorpe *et al.*, 2015). Na biologia vascular, as PI3Ks de classe I são as isoformas mais bem caracterizadas, enquanto pouco se sabe a respeito das classes II e III (Morello *et al.*, 2009).

Os vasos sanguíneos são conhecidos por expressar múltiplas PI3Ks, incluindo pelo menos a p110 α , a p110 β e a p110 δ (Wang *et al.*, 2006). A atividade desta enzima possui grande importância para o sistema cardiovascular, como demonstrado por Li e colaboradores, que obtiveram uma melhora na disfunção cardíaca e sobrevida na sepse devido à ativação miocárdica da PI3K p110- α (Li *et al.*, 2012).

A ativação da PI3K pode ocorrer, entre outros mecanismos, através das pequenas proteína G da família Ras, como descrito previamente. A Ras interage diretamente com a subunidade catalítica da p110 da PI3K, ocasionando a translocação da PI3K para a membrana plasmática e estimulando sua atividade lipídio cinase (Yang *et al.*, 2012). A PI3K fosforila o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P₂, ou PIP₂) na posição 3'OH para produzir PtdIns(3,4,5)P₃ (PIP₃) na parte interna da membrana plasmática (Osaki *et al.*, 2004). Por sua vez, o PIP₃ serve como local de ancoragem para várias proteínas contendo domínios de ligação de fosfolipídios, tais como o domínio PH que está presente nas cinases PDK-1 e Akt (Katz *et al.*, 2007). A Akt liga-se ao PIP₃ na membrana plasmática, permitindo o acesso da PDK-1 ao resíduo Thr 308, na alça de ativação, ocorrendo assim ativação parcial da Akt. Esta modificação na Akt é suficiente para ativar a proteína alvo da rapamicina complexo 1 em mamíferos (mTORC1), pela fosforilação direta e inativação do substrato rico em prolina (PRAS40) e do complexo da esclerose tuberosa 2 (TSC2). A fosforilação da Akt no resíduo Ser473 pela proteína alvo da rapamicina complexo 2 em mamíferos (mTORC2), ou pela proteína cinase dependente de DNA (DNA-PK), estimulam a sua atividade total. A ativação total da Akt leva a eventos de fosforilação adicional, substrato-específicos, no citoplasma e núcleo, incluindo a fosforilação inibitória de proteínas pró-apoptóticas FOXO. Além dessa atividade, a Akt medeia outras funções celulares, como a angiogênese, metabolismo, crescimento, proliferação, sobrevivência, síntese proteica e transcrição (Hemmings e Restuccia, 2012; Gao *et al.*, 2014).

Recentemente, Liu e colaboradores mostraram evidências de um novo mecanismo de ativação da Akt independente da PDK-1. Segundo

eles, a Akt pode ser ativada diretamente pela ciclina A2/CDK2³, por meio de fosforilação dos resíduos Ser477 e Thr479 presentes na Akt. Entretanto mais estudos devem ser realizados para o melhor entendimento deste novo mecanismo de ativação e determinação de quais cascatas de sinalização distais da Akt podem ser afetadas por ele (Gao *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014)

Do mesmo modo que os mecanismos de ativação da via PI3K/Akt, a desativação desta via também merece destaque, pois a ausência de mecanismos que interrompam a sinalização está associada, por exemplo, com a progressão não coordenada do ciclo celular e a migração celular desordenada, entre outros (Di Cristofano *et al.*, 2000). A fosfatase homóloga á tensina (PTEN) e a miotubularina são exemplos de fosfatases lipídicas expressas no tecido vascular que desfosforilam o PIP3 (Morello *et al.*, 2009). Além disso, a retirada do fosfato dos resíduos Thr308 e Ser473 da Akt é mediada pela proteína fosfatase 2A (PP2A) (Andjelkovic *et al.*, 1996) e proteína fosfatase rica em repetições leucina e domínios PH (PHLPP1/2) (Brognard *et al.*, 2007)

Como descrito anteriormente, um dos principais alvos de fosforilação da PI3K é a Akt. São conhecidas três isoformas diferentes de Akt: Akt1, Akt2 e Akt3; destas a Akt1 parece ser a enzima mais relevante para as funções cardiovasculares. A via PI3K/Akt está envolvida em diversas funções, tais como regulação do tônus vascular, angiogênese, controle da adesão e recrutamento de leucócitos para a parede vascular (Yu *et al.*, 2015). Parte destes efeitos se devem à atividade reguladora positiva da eNOS promovida pela PI3K/Akt. A via PI3K/Akt, quando ativada, fosforila a eNOS nos resíduos Ser1177, aumentando a atividade basal e estimulando a enzima, assim liberando mais NO. Este sítio de fosforilação da eNOS (Ser1177) não é exclusivo da Akt outras cinases também podem fosforilá-lo, como é o caso da AMPK e da PKA (Morello *et al.*, 2009).

No sistema cardiovascular a via PI3K/Akt pode ser ativada por fatores humorais como o fator de crescimento endotelial vascular, insulina, ou por meio da tensão de cisalhamento, entre outros. Os fatores humorais ligam-se a receptores GPCRs ou RTKs, e a tensão de cisalhamento parece ativar a via integrina $\alpha 1\beta 1$, que funciona como sensor mecânico. Nas células musculares lisas, a sinalização da

³ CiclinaA2/CDK2- A ciclina é uma proteína formada durante o ciclo celular, ativa as cinases dependentes de ciclina (CDK), atua como regulador do ciclo celular, sendo que aumentos na expressão de ciclinas são encontrados em vários tumores (Yam *et al.*, 2002).

PI3K/Akt possui um papel importante na regulação da contratilidade e proliferação principalmente através da PI3K γ . Esta isoforma da PI3K induz a entrada de cálcio na membrana plasmática por meio da fosforilação de canais de cálcio tipo-L, subtipo Ca β 2a (Viard *et al.*, 2004). Além desta, o músculo liso vascular expressa pelo menos outras 4 isoformas de PI3K, incluindo enzimas de classe I p110 α e p110 β e enzimas de classe II PI3K-C2 α e C2 β (Wang *et al.*, 2006). Dentre essas destaca-se a PI3K-C2 α , cuja atividade pode resultar em supressão da fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP), que possui papel importante na diminuição da interação dos filamentos de actina e miosina e quando inibida, passa a contribuir para o aumento da pressão arterial (Yoshioka *et al.*, 2007; Seok *et al.*, 2010).

Apesar de não participar diretamente do controle do tônus vascular, a serina/treonina cinase mTOR pode ser um alvo distal da cascata de sinalização da PI3K/Akt. A mTOR é ativada por uma ampla gama de estímulos celulares como fatores de crescimento, nutrientes, energia, e abundância de aminoácidos (Bhatt *et al.*, 2012). A mTOR pode ser subdividida em dois complexos de sinalização multiproteicos, mTORC1 e mTORC2, os quais possuem diferentes sensibilidades ao macrolídeo rapamicina, sendo que a mTORC1 é sensível, enquanto que a mTORC2 é insensível (Jacinto *et al.*, 2004). A mTORC1 pode ser ativada pela Akt, que o faz por meio da fosforilação e inibição do complexo TSC1/2 (Laplane *et al.*, 2012). Quando este complexo está inativado ocorre a ativação da mTORC1. A mTORC1 regula a tradução de proteínas, o crescimento celular, o transporte intracelular, o metabolismo e a biogênese lipídica. Por sua vez, mTORC2 regula a sobrevivência celular, o metabolismo e a organização do citoesqueleto (Zoncu *et al.*, 2011)

1.6 A proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK)

A proteína cinase ativada por AMP (AMPK) é uma proteína cinase serina/treonina heterotrimérica constituída de subunidade catalítica (α) e duas subunidade regulatórias (β e γ), que exibem múltiplas isoformas, resultantes de combinações heterotriméricas. Como o próprio nome sugere, a AMPK é ativada, principalmente, por meio do aumento de concentrações intracelulares de AMP (Hardie *et al.*, 2012). Além disso, a AMPK, em células endoteliais, pode ser regulada por estímulos que afetem os níveis celulares de ATP, como a hipóxia, o estresse de cisalhamento dos fluidos, a elevação do Ca $^{2+}$, e por agonista

e hormônios como a adiponectina. Sabe-se que a AMPK nas células endoteliais está envolvida na regulação da oxidação de ácidos graxos, atividade de proteínas G pequenas e produção de NO, bem como na inflamação e angiogênese (Fisslthaler *et al.*, 2009).

1.7 Plantas medicinais: *Plinia peruviana*

O Brasil possui quase um terço da flora mundial representada em dez biomas com uma biodiversidade exuberante. Entretanto, o uso de fitomedicamentos ainda não é uma realidade no âmbito do Sistema Único de Saúde (Macedo *et al.*, 2009). Há um grande desafio de como aproveitar racionalmente a biodiversidade brasileira visando à produção de medicamentos, e transformação do grande patrimônio genético presente na natureza em riquezas, gerando empregos qualificados e base tecnológica industrial (Calixto, 2003).

Salienta-se que o Brasil é o terceiro maior produtor de frutas no mundo (Carvalho *et al.*, 2013) sendo que só de jabuticaba foram comercializadas cerca de 2000 toneladas no ano de 2008 no entreposto da CEAGESP (Danner *et al.*, 2010). A jabuticaba ou jabuticabeira produz seus frutos duas ou mais vezes ao ano (Souza-Moreira *et al.*, 2010) os quais são coletados por pequenas cadeias produtivas, sendo os mesmos utilizados na produção de geleias, licores, destilados e vinho (Fortes *et al.*, 2011) ou consumidos *in natura*. Estes fatos revelam que no Brasil há uma produção extrativista na forma *in natura* do fruto da jabuticaba e em ambos os casos, a casca do fruto é subutilizada ou simplesmente descartada, o que pode gerar problemas ambientais.

Além disso, são utilizados na medicina popular no tratamento de várias doenças, como o diabetes, e a inflamação crônica das amígdalas (Sacchet *et al.*, 2015). São conhecidas cerca de nove espécies de jabuticabeira, onde destacam-se a *Plinia trunciflora* (DC) Berg ('Jabuticaba de Cabinho'), *Plinia cauliflora* ('Jabuticaba Paulista' ou 'Jabuticaba Açú') e *Plinia jaboticaba* (Vell) ('Jabuticaba Sabará') (Wagner *et al.*, 2011). O gênero *Plinia* pertence à família Myrtaceae que inclui 4.620 espécies distribuídas em 140 gêneros, cuja ocorrência é descrita em regiões tropicais e subtropicais do mundo, principalmente na América do Sul e Central, além da Austrália (Sacchet *et al.*, 2015).

Vários compostos fitoquímicos têm sido identificados nas diferentes espécies de *Plinia*. Entre eles pode-se citar os compostos fenólicos obtidos em extratos de folhas de *Plinia cauliflora*, sendo atribuída a estes compostos as atividades antioxidantes e antimicrobianas. Além disso, em extratos polares desta planta foram

identificados flavonóides e taninos, incidindo numa atividade antimicrobiana contra espécies de *Candida* (Souza-Moreira *et al.*, 2010). O mesmo efeito foi obtido contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras através de um extrato das folhas da planta, sem apresentar efeitos tóxicos (Chavasco *et al.*, 2014). Já extratos da semente de *Plinia cauliflora* apresentaram atividade antioxidante, antiproliferativa e quimopreventiva em células de câncer bucal (Wang *et al.*, 2014). Além destes, também foram observados efeitos hipolipemiantes em ratos sob dieta moderada de alto teor de gordura com a administração de uma farinha da casca do fruto da jabuticaba (Araujo *et al.*, 2014). Estudos recentes demonstraram o potencial vasorrelaxante e hipotensor da utilização de um extrato hidroalcoólico da espécie *Plinia cauliflora* jabuticaba, evidenciando que o gênero *Plinia* possui efeitos benéficos ao sistema cardiovascular (Lobo De Andrade *et al.*, 2015).

Outra espécie do gênero, a *Plinia peruviana* (Figura 2), também conhecida como *Eugenia cauliflora* Miq., *Eugenia guapurium* DC., *Eugenia rabeniana* Kiaersk., *Guapurium fruticosum* Spreng., *Guapurium peruvianum* Poir., *Myrciaria guapurium* (DC.) O.Berg, *Myrciaria peruviana* (Poir.) Mattos, *Myrciaria peruviana* var *trunciflora* (O.Berg) Mattos, *Myrciaria trunciflora* O. Berg, *Plinia trunciflora* (O.Berg) Kausel⁴, presente na flora brasileira possui atividades biológicas como a ação antimicrobiana contra leveduras e bactérias evidenciadas no óleo essencial desta planta (Lago *et al.*, 2011). No entanto esta espécie, até o momento, possui estudos científicos escassos acerca de suas atividades biológicas, e/ou efeitos tóxicos.

⁴ The plant list: a working list of all plant species. Disponível em: < <http://www.theplantlist.org/tpl/record/kew-161390>> Acesso em 03 de agosto de 2015.



Figura 2: Jabuticaba (*Plinia peruviana*)- árvore e fruto

Fonte: Dra. Adriana Carla Dias Trevisan

Cabe ainda salientar que este estudo faz parte de um projeto que visa à conservação de recursos nativos e recuperação da paisagem com espécies nativas. Para isto, faz-se necessário o beneficiamento de biomassas residuais (cascas do fruto da jabuticaba) objetivando não apenas a redução dos danos ambientais ocasionados pelo mau uso destas biomassas mas também, a geração de produtos inovadores às indústrias farmacêutica e cosmética nacional, promovendo o estímulo ao desenvolvimento social rural por qualificação da produção. Além disso, a espécie *Plinia peruviana* é amplamente consumida pela população sem apresentar danos à saúde destes consumidores, embora, diferentes substâncias com atividades biológicas estão sendo identificadas nas diferentes espécies de jabuticaba. Os estudos científicos escassos acerca de suas atividades biológicas da *Plinia peruviana* sobre os sistemas orgânicos nos levou a investigar a hipótese de que preparados obtidos a partir das cascas da jabuticaba podem apresentar efeitos diretos sobre a função e tônus vascular.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito de extratos brutos obtidos das cascas do fruto da *Plinia peruviana* sobre o tônus vascular em aorta de rato, identificando os possíveis mecanismos de ação envolvidos neste efeito *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de extratos hidroalcoólico obtidos por extração assistida em microondas da casca do fruto da *Plinia peruviana* rotaevaporado (EBM-1) e não rota evaporado (EBM-2) sobre o tônus vascular;
- Investigar a participação do endotélio vascular no tônus vascular do extrato (EBM) com maior eficiência;
- Identificar o envolvimento da via do óxido nítrico e guanilato ciclase o efeito do EBM com maior eficiência;
- Analisar a o envolvimento de prostanoídes no efeito vasorrelaxante do EBM com melhor efeito;
- Caracterizar a participação de receptores histamínicos, e muscarínicos no efeito induzido pelo EBM de maior atividade;
- Avaliar o envolvimento de canais de potássio no efeito induzido pelo EBM que apresentou o efeito mais eficiente;
- Analisar a participação de espécies reativas de oxigênio no efeito promovido pelo EBM escolhido devido a sua eficiência;
- Investigar o envolvimento da via PI3K/Akt/mTOR e AMPK no efeito induzido pelo EBM escolhido;
- Avaliar o efeito induzido por soluções obtidas da casca do fruto da *Plinia peruviana* por meio de diferentes métodos de extração, e compará-los ao efeito gerado pelo EBM mais eficiente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material botânico

Os extratos de *Plinia peruviana* fornecidos pelo Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da UFSC, foram produzidos pela Dra. Aline Pereira, e estudantes de iniciação científica Fausto Rodrigues Cardoso e Mayara Breskovit, sob orientação do professor Dr. Marcelo Maraschin. As cascas dos frutos, utilizadas para a obtenção dos extratos, foram fornecidas por produtores do estado de Minas Gerais, sob coordenação da professora Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau. Uma vez recebido, o material foi armazenado em freezer a -20 °C até o início do processamento das amostras e obtenção dos extratos.

A identificação taxonômica foi realizada pelo Dr. Martin Molz pesquisador do Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (FZB-MCN). Entretanto, até o momento da apresentação deste trabalho, não havia sido realizado o depósito de amostra em herbário.

3.2 Obtenção e caracterização dos extratos de *Plinia peruviana*⁵

Neste estudo, utilizamos extratos obtidos a partir da casca do fruto da *Plinia peruviana*, os quais foram obtidos por extração assistida por micro-ondas, ultrapressão ou ultrassom, cujas etapas estão resumidas a seguir. Para todos os extratos, a eficiência do processo de extração de compostos de interesse foi monitorada por espectrofotometria UV-visível (UV-Vis). O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado conforme metodologia descrita por Randhir e colaboradores (2002), com a utilização do reativo de Folin-Ciocalteu. A quantificação dos compostos fenólicos utilizou uma curva-padrão (ácido gálico – 12,5 µg/mL - 300 µg/mL - $y = 0,0032x$, $r^2 = 0,99$), e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico/ml de extrato.

⁵ A descrição resumida da metodologia utilizada para obtenção dos extratos, e características gerais dos mesmos, estão apresentados nesta dissertação com autorização da Dra. Aline Pereira.

3.2.1 Extração assistida por micro-ondas

Em resumo, o procedimento de extração utilizando radiação micro-ondas foi realizado irradiando as amostras (1 g) de casca de jabuticaba liofilizada em pó e na presença de 9 g de solução extratora (pH 3,6). Em forno de micro-ondas, foi realizado o procedimento que consiste de 3 pulsos de 5 segundos com intervalo de 60 segundos com frequência de 2,45 GHz. O extrato obtido foi filtrado em suporte de celulose sob vácuo e o sobrenadante recuperado de cada extrato bruto obtido por micro-ondas foi denominado EBM-1, EBM-2 e EBM-3. Destes, apenas o EBM-1 foi submetido ao processo de rota-evaporação. A solução extratora, rendimento e a quantificação de compostos fenólicos totais dos extratos brutos obtidos por extração assistida por micro-ondas estão mostradas na tabela apresentada no ANEXO A.

3.2.2 Extração assistida por ultrapressão

Em resumo, o processo extrativo com alta pressão utilizou uma célula extratora de aço inoxidável acoplada a um sistema para a geração da pressão, conduzido em temperatura ambiente. A extração sob alta pressão consiste da exposição da biomassa (1 g) de casca do fruto de *Plinia peruviana* liofilizada em pó e 9 g solução extratora etanol (pH 3,6), sob pressão de 580 kgf/cm² durante um período de 1 ou 3 horas. As amostras foram filtradas a vácuo e obteve-se o extrato bruto hidroalcoólico obtido por ultrapressão (EBHUP). A solução extratora, rendimento e a quantificação de compostos fenólicos totais dos extratos brutos obtidos por extração assistida por ultrapressão estão mostradas na tabela apresentada no ANEXO B.

3.2.3 Extração assistida por ultrassom

Em resumo, no procedimento de sonicação das amostras, 9 g de solução extratora etanol 50 % (pH 3,6) foram adicionados a 1 g de casca do fruto da *Plinia peruviana* liofilizada em pó, seguido de exposição ao ultrassom (150 W, 40 kHz) a 25 °C por período de 1 a 4 minutos. O extrato obtido foi filtrado em suporte de celulose sob vácuo e o sobrenadante recuperado denominou-se extrato bruto hidroalcoólico obtido por ultrassom (EBHUS). A solução extratora, rendimento e a quantificação de compostos fenólicos totais dos extratos brutos obtidos por extração assistida por ultrassom estão mostradas na tabela apresentada no ANEXO C.

3.3 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com idade entre três a quatro meses, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram condicionados no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia em ciclo claro/escuro de 12 horas (claro 06:00 às 18:00 h) em temperatura e luminosidade controladas (22 ± 2 °C), com livre acesso à água e ração. Os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pela Comissão de ética no Uso de Animais da Universidade de Santa Catarina (protocolo PP00566).

3.4 Drogas e reagentes

As seguintes drogas e reagentes foram utilizadas para execução deste estudo: fenilefrina, acetilcolina, L-NAME, 1400W, carboxi-PTIO, ODQ, KT5823, pirilamina, histamina, atropina, indometacina, tetraetilamônio (TEA), apamina, iberiotoxina, glibenclamida, 4-aminopiridina, tempol, apocinina, wortmanin, inibidor da Akt 1/2, dorsomorfina e rapamicina, (todos comprados da Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). A cetamina e a xilazina (Syntec do Brasil) foram adquiridas pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC.

As soluções de estoque e de uso de fenilefrina, acetilcolina, L-NAME, 1400W, carboxi-PTIO, pirilamina, atropina, TEA, iberiotoxina, 4-aminopiridina, tempol e apocinina foram preparadas em H₂O destilada e solução nutritiva fisiológica, respectivamente. Já o ODQ, a glibenclamida, o wortmanin, o inibidor da Akt 1/2, a dorsomorfina e a rapamicina foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), e o estoque de histamina e apamina foram preparadas em HCl (0,1 N). Todos os extratos foram solubilizados em H₂O destilada. De acordo com os experimentos preliminares e/ou paralelos realizados, nenhum dos veículos utilizados interferiu com a reatividade dos anéis de aorta a agentes vasoativos.

3.5 Reatividade vascular de anéis de aorta em sistema de órgão isolado

Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente), administrados pela via intraperitoneal. Após a obtenção da anestesia geral, os animais foram posicionados em decúbito

dorsal, para realização de toracotomia e visualização da, aorta descendente, a qual foi cuidadosamente removida e acondicionada em placa de Petri com solução nutritiva fisiológica (composta por: NaCl, 131,3 mM; KCl, 4,7 mM; KH_2PO_4 , 1,18 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,17 mM; NaHCO_3 , 14,9 mM; Dextrose, 5,5 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,6 mM; EDTA, 0,03 mM). Posteriormente, todo o tecido conectivo perivascular foi removido e a aorta foi segmentada em anéis de 3 a 5 milímetros de comprimento. Nos experimentos em que se almejava a ausência de endotélio funcional, os anéis de aorta foram submetidos à fricção mecânica com haste metálica no lúmen do vaso. Duas hastes metálicas foram transpassadas na luz do vaso, as quais foram conectadas a transdutores de força para aferição da tensão isométrica dos vasos. Todo este conjunto foi acomodado em cubas de órgão isolado contendo solução nutritiva a 37 °C, sob oxigenação contínua com mistura carbogênica (95% O_2 e 5 % CO_2), e tensão basal de 1 g. As variações na tensão das preparações foram obtidas através de polígrafo digital modelo PowerLab (AD Instruments, Austrália), e registrados através do software LabChart versão 7.1 (AD Instruments, Austrália).

Após a montagem dos anéis de aorta, a preparação foi mantida em estabilização por um período de 1 hora, com trocas do líquido nutritivo a cada 15 minutos. Em seguida o líquido nutritivo foi substituído por uma solução modificada contendo 120 mM de cloreto de potássio (KCl), aguardando-se a formação de um platô contrátil, após o qual as preparações foram lavadas por três vezes consecutivas com líquido nutritivo. Respeitou-se um novo período de estabilização de 30 minutos, com a manutenção das substituições de líquido nutritivo a cada 15 min, que foi seguido da adição de fenilefrina (1 μM). Após a obtenção de um platô de resposta contrátil, adicionou-se acetilcolina (1 μM), registrando-se o relaxamento induzido pela mesma naquelas preparações com endotélio funcional, ou ausência de relaxamento onde havia ausência de endotélio funcional. Para os protocolos experimentais com objetivo de avaliar a participação do endotélio foram utilizados anéis aórticos que apresentaram no mínimo 80% de relaxamento em resposta à acetilcolina (endotélio preservado).

3.6 Protocolos experimentais

3.6.1 Estudo da participação do endotélio vascular no relaxamento pelo EBM-1 e EBM-2

Para verificar o efeito dos extratos obtidos da casca do fruto da *Plinia peruviana* em anéis de aorta foi respeitado o intervalo de estabilização de 1 hora após a confirmação da preservação ou ausência do endotélio funcional. Nestes experimentos foram utilizados anéis de aorta com e sem endotélio funcional. Após a adição de fenilefrina (1 μM) às preparações e formação do platô contrátil induzido por esse vasoconstritor, foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas (curvas concentração resposta) dos extratos de *Plinia peruviana*, EBM-1 e EBM-2, nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g/ml}$. Ao final deste procedimento, foi aguardado o intervalo de estabilização de 1 hora, com substituições da solução nutritiva fisiológica a cada 15 minutos. Em seguida foi induzida uma nova contração com fenilefrina (1 μM) e posterior relaxamento com acetilcolina (1 μM), para verificar a integridade da preparação após a exposição aos extratos (dados não mostrados).

3.6.2 Análise da participação da via do óxido nítrico e guanilato ciclase solúvel no efeito vasorrelaxante do EBM-1 em anéis de aorta

Anéis de aorta com endotélio funcional foram utilizados a fim de identificar o envolvimento da via do óxido nítrico no vasorrelaxamento induzido pelo extrato EBM-1. Para isto, foram incubados, durante 30 minutos e em diferentes preparações: i) o inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase, L-NAME (100 μM); ii) o inibidor seletivo da enzima óxido nítrico induzível, 1400W (10 μM); iii) o sequestrador de NO, carboxi-PTIO (300 μM); iv) o inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel ODQ (10 μM); ou v) o inibidor da proteína cinase G (PKG) KT5823 (10 μM). Feito isto, foi promovida uma contração com fenilefrina (1 μM), ainda na presença destas substâncias e, sobre o platô contrátil, foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas do EBM-1 (1, 5, 10, 20, 30, 40 $\mu\text{g/ml}$), sendo os efeitos relaxantes obtidos na presença e ausência destas drogas comparados. Além disso, foi confirmada a eficácia do L-NAME, na mesma concentração empregada, através da adição de acetilcolina (1 μM) em anéis de aorta previamente contraídos com fenilefrina (1 μM) (dados não mostrados). A influência

do inibidor de PKG (KT5823, 1 μ M), bem como de seu veículo (DMSO, 10 μ l), no relaxamento induzido pela acetilcolina (1 nM-100 μ M) também foi avaliada.

3.6.3 Estudo do envolvimento da via das PGI₂ no efeito vasorrelaxante

Após a confirmação da presença do endotélio funcional dos anéis aórticos de rato e novo período de estabilização, as preparações foram incubadas durante 30 minutos com o inibidor não seletivo das ciclooxigenases (COXs) – indometacina (10 μ M). Na sequência as preparações, ainda na presença do inibidor, foram estimuladas com fenilefrina (1 μ M) e ao atingirem o platô contrátil foram expostas ao EBM-1, como descrito previamente. O relaxamento resultante foi comparado com aquele obtido em preparações sem o inibidor.

3.6.4 Investigação da participação dos receptores histamínicos e muscarínicos no relaxamento de anéis de aorta

Para verificar a participação dos receptores histamínicos e muscarínicos no relaxamento de anéis aórticos de rato, foi utilizado o antagonista de receptores H₁ de histamina, pirilamina (10 μ M) e o antagonista de receptores muscarínicos, atropina (1 μ M). As preparações com endotélio funcional permaneceram incubadas com esses antagonistas por 30 minutos, antes da indução da contração pela fenilefrina (1 μ M). No momento em que a preparação atingiu a fase tônica da contração, avaliou-se os efeitos de concentrações cumulativas do EBM-1 (1, 5, 10, 20, 30, 40 μ g/ml), ainda na presença dos antagonistas. Com a finalidade de comprovar a eficácia das concentrações de pirilamina e atropina, foram utilizadas preparações pré-contraídas com fenilefrina (1 μ M), expostas aos respectivos agonistas histamina e acetilcolina (dados não mostrados).

3.6.5 Avaliação da contribuição dos canais de K⁺ no relaxamento de anéis de aorta induzido pelo EBM-1

A participação de canais de K⁺ no vasorrelaxamento induzido pelo EBM-1 foi analisada em preparações com endotélio funcional. Para isso, diferentes os anéis de aorta foram incubados durante 30 minutos com: i) o bloqueador não seletivo de canais de K⁺ ativados por cálcio e

voltagem tetraetilamônio (TEA, 10 mM); ii) o bloqueador seletivo de canal de K^+ de baixa condutância ativado por Ca^{2+} , apamina (0,1 μ M); iii) o bloqueador seletivo de canal de K^+ de alta condutância ativado por cálcio, iberiotoxina (100 nM); iv) o bloqueador seletivo de canal de K^+ sensível ao ATP, glibenclamida (10 μ M) e; v) o bloqueador seletivo de canal de K^+ ativado por voltagem, 4-aminopiridina (1 mM), em diferentes preparações durante 30 minutos. Ainda na presença destes inibidores foi adicionado fenilefrina (1 μ M) e, ao atingir-se a estabilização da contração iniciou-se a adição de concentrações crescentes cumulativas do EBM-1 (1-40 μ g/ml). O relaxamento resultante foi comparado àquele obtido em preparações que não foram expostas aos inibidores.

3.6.6 Determinação da influência do estresse oxidativo no efeito relaxante ocasionado pelo EBM-1

Para avaliar a influência do estresse oxidativo produzido pelas ROS no relaxamento induzido pelo extrato EBM-1 em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (1 μ M), foram utilizados o sequestrador de ânions superóxido tempol (0,3 mM), e o inibidor da NADPH oxidase apocinina (0,1 mM) em preparações com endotélio funcional. Tais inibidores foram incubados em preparações diferentes por um período de 30 minutos antes da adição de fenilefrina e subsequente exposição das preparações às concentrações crescentes do EBM-1 (1-40 μ g/ml). O efeito registrado foi comparado com o relaxamento obtido na ausência dos inibidores.

3.6.7 Estudo da participação da via PI3K/Akt/mTOR e AMPK no relaxamento de anéis de aorta à EBM-1

Nestes experimentos diferentes preparações com endotélio funcional foram incubadas por um período de 30 minutos com: i) o inibidor seletivo da PI3K wortmannin (500 nM); ii) o inibidor seletivo das Akt 1/2 (10 mM); iii) o inibidor de mTOR rapamicina (20 μ M), ou; iv) o inibidor da AMPK, dorsomorfina (2 μ M). Na sequência, foi adicionada fenilefrina (1 μ M), aguardando-se o platô da contração obtida para acrescentar-se concentrações crescentes e cumulativas do EBM-1 (1-40 μ g/ml). O efeito do extrato EBM-1 na presença destes inibidores foi comparado com o relaxamento induzido na ausência dos mesmos. Além disso, avaliou-se a influência do inibidor da Akt1/2 (10 mM) no relaxamento mediado pela acetilcolina, bem como do veículo,

dimetilsulfóxido (DMSO), o qual foi utilizado para dissolver vários inibidores utilizados neste estudo (ODQ, glibenclamida, wortmanin, o inibidor da Akt 1/2, dorsomorfina e rapamicina).

3.6.8 Avaliação dos diferentes métodos de extração sobre o efeito vasorrelaxante dos extratos de *Plinia peruviana*

Com o intuito de avaliar se a alteração do método extrativo, substância extratora e tempo de exposição ao extrator (ver item 3.2 para detalhes de preparo) seria capaz de influenciar o efeito relaxante descrito neste estudo, os efeitos dos extratos EBM-3, EBHUP-1, EBHUP-2, EBHUP-3, EBHUS-1e EBHUS-2 foram analisados. Para isso, concentrações crescentes e cumulativas dos extratos (1, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/ml) foram adicionados às preparações de anéis de aorta durante o platô contrátil induzido pela fenilefrina (1 µM). Essa avaliação foi realizada apenas em preparações com endotélio funcional. Cada preparação foi exposta a apenas um dos extratos avaliados. Os efeitos relaxantes destes extratos foram comparados ao gerado pelo extrato EBM-1.

3.7 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). O número de preparações utilizadas em cada grupo experimental variou de 4 a 9, todas obtidas de aortas de diferentes animais. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism versão 5.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Para análise dos testes paramétricos, de medidas repetidas e não repetidas, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. O nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$).

3.8 Drogas e reagentes

As seguintes drogas e reagentes foram utilizadas para execução deste estudo: fenilefrina, acetilcolina, L-NAME, 1400W, carboxi-PTIO, ODQ, KT5823, pirlamina, histamina, atropina, indometacina, tetraetilamônio (TEA), apamina, iberiotoxina, glibenclamida, 4-aminopiridina, tempol, apocinina, wortmanin, inibidor da Akt 1/2, dorsomorfina e rapamicina, (todos comprados da Sigma-Aldrich, Saint

Louis, MO, EUA). A cetamina e a xilazina (Syntec do Brasil) foram adquiridas pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC.

As soluções de estoque e de uso de fenilefrina, acetilcolina, L-NAME, 1400W, carboxi-PTIO, pirilamina, atropina, TEA, iberiotoxina, 4-aminopiridina, tempol e apocinina foram preparadas em H₂O destilada e solução nutritiva fisiológica, respectivamente. Já o ODQ, a glibenclamida, o wortmanin, o inibidor da Akt 1/2, a dorsomorfina e a rapamicina foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), e o estoque de histamina e apamina foram preparadas em HCl (0,1 N). Todos os extratos foram solubilizados em H₂O destilada. De acordo com os experimentos preliminares e/ou paralelos realizados, nenhum dos veículos utilizados interferiu com a reatividade dos anéis de aorta a agentes vasoativos .

4. RESULTADOS

4.1 Influência do endotélio vascular no relaxamento pelo EBM-1 e EBM-2

Para avaliar o possível efeito vasorrelaxante dos extratos obtidos por micro-ondas rotaevaporado (EBM-1) e não rotaevaporado (EBM-2), foram adicionadas as concentrações cumulativas de ambos os extratos em preparações previamente contraídas por fenilefrina, obtendo-se curvas de respostas dependentes da concentração (CCR). As Figuras 3A e 3B mostram que, em preparações com endotélio funcional (E+), mas não naquelas em que o endotélio foi removido mecanicamente (E-), ambos os extratos promoveram redução do tônus vascular de forma dependente da concentração. Em preparações com endotélio funcional o EBM-1 apresentou efeito máximo (E_{\max}) de relaxamento de 104,7% (91,5- 117,8%)⁶, enquanto o E_{\max} gerado pelo extrato EBM-2 foi de 93,3%, (67,9-118,6%) (Figura 3B).

Com a finalidade de analisar a potência dos extratos EBM-1 e EBM-2 fez-se a comparação entre as CCRs geradas pelos extratos, como mostra a Figura 4. Pode-se observar que, quando plotadas na mesma figura, a CCR gerada pelo EBM-1 apresenta-se mais para a esquerda do gráfico, quando comparada à CCR gerada pelo EBM-2. Essa diferença foi confirmada pela análise da concentração efetiva 50% (CE_{50}), que variou de 11,2 (6,5 a 15,9) $\mu\text{g/ml}$ para 20,2 (14,6-25,8) $\mu\text{g/ml}$ (EBM-1 e EBM-2, respectivamente). Com base nesses dados, o EBM-1 foi utilizado nos experimentos que visaram à investigação do mecanismo de ação vasorrelaxante nos anéis de aorta de rato.

⁶ Os valores apresentados entre parênteses para E_{\max} e CE_{50} mostram o intervalo de confiança.

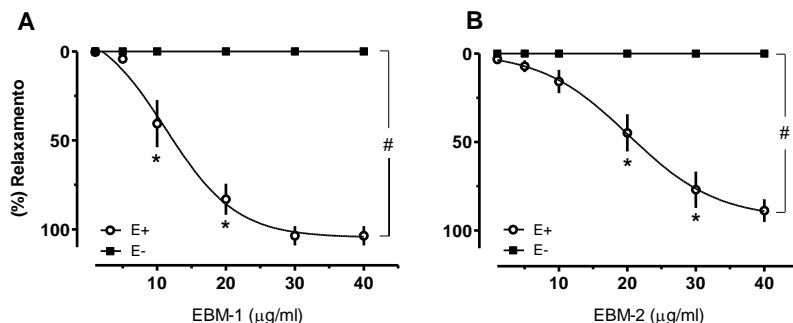


Figura 3: Relaxamento vascular dependente do endotélio induzido pelos extratos EBM-1 e EBM-2, obtidos a partir das cascas do fruto da *Plinia peruviana*. Anéis de aorta com (E+) ou sem (E-) endotélio funcional, previamente contraídos por fenilefrina, foram expostos às concentrações cumulativas do EBM-1 (A) ou EBM-2 (B). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (n de 4 a 6 preparações por grupo). A comparação estatística dos efeitos obtidos entre os grupos foi realizada por meio de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni; # indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo E- (quadrados pretos). A diferença no relaxamento induzido pelas diferentes concentrações de extrato dentro de um mesmo grupo foi analisada por meio de ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni; * indica $p < 0,05$ em comparação à concentração anterior.

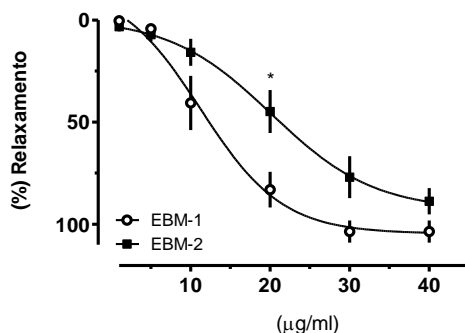


Figura 4: Comparação da potência vasorrelaxante do extrato EBM-1 (rotaevaporado) e EBM-2 (não rotaevaporado) em aortas de ratos. A potência do EBM-1 e EBM-2 foram avaliadas construindo-se curvas concentração resposta (CCR) para ambos os extratos. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (n de 5 a 6 preparações por grupo). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de duas vias,

seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. * indica $p < 0.05$ em comparação ao grupo EBM-1 (círculos brancos).

4.2 Participação da via do NO e GMPc no efeito vasodilatador do EBM-1

O relaxamento induzido pelo EBM-1 (Figura 5A) foi abolido pela incubação com o inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase, L-NAME (Figuras 5B e 5C), mas não sofreu qualquer alteração com o inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase induzida, 1400W (Figura 5D). Corroborando com o efeito do L-NAME, observou-se uma redução acentuada do relaxamento induzido pelo EBM-1 após incubação das preparações com o sequestrador de NO carboxi-PTIO (Figura 5E), no qual a E_{\max} gerada pelo EBM-1 foi reduzida de 91,8% (85,5-98,2%) para 25,9 % (20,6-31,3%).

A incubação com o inibidor da guanilato ciclase solúvel ODQ impediu o efeito vasorrelaxante do EBM-1 em anéis de aorta de rato pré-contraídos por fenilefrina como pode ser observado nos registros típicos Figuras 6A e 6B e na Figura 6C. Porém, ao adicionar-se o inibidor de PKG KT5823, não houve alteração no relaxamento gerado pelo EBM-1 (Figura 6D), e tampouco pela acetilcolina (Figura 6E), mesmo quando concentrações maiores de KT5823 (10 μ M) foram utilizadas.

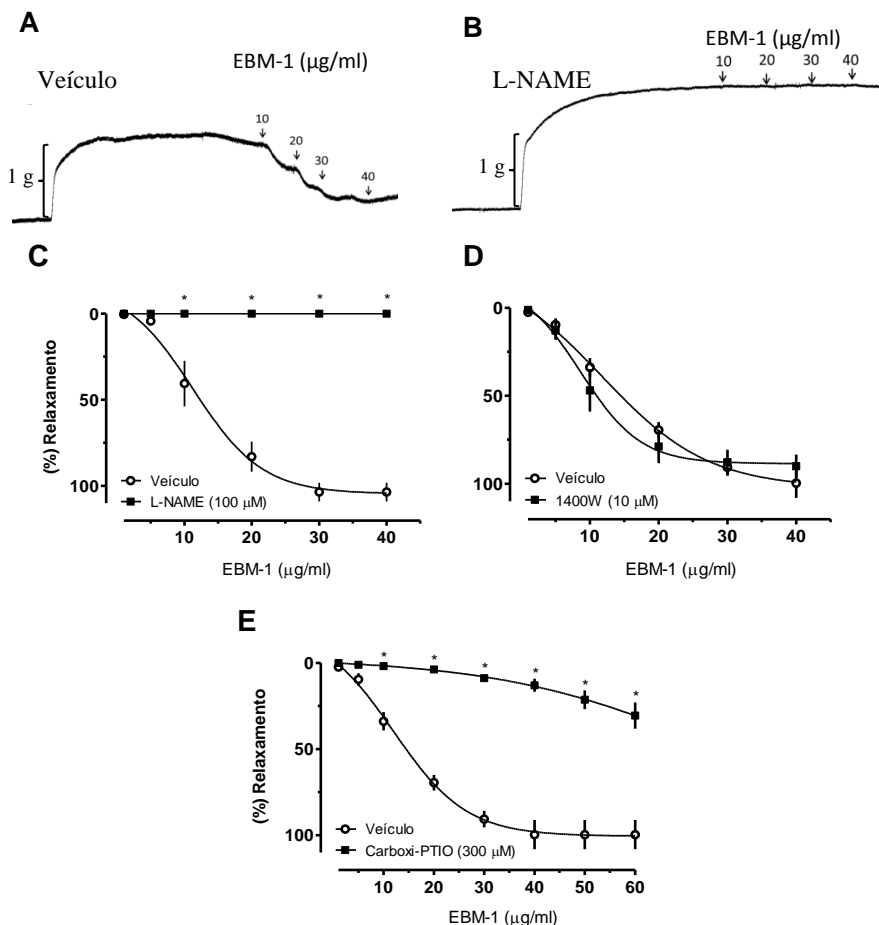


Figura 5: Papel da óxido nítrico sintase e do óxido nítrico no relaxamento induzido pelo EBM-1 em anéis de aorta de rato. Resposta de preparações de anéis de aorta com endotélio funcional, pré-contraídos por fenilefrina, às concentrações crescentes cumulativas do EBM-1(A) na presença de L-NAME (B e C), 1400W (D), ou carboxi-PTIO (E). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (n de 5 a 6 preparações por grupo). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. * indica $p < 0.05$ em comparação com o grupo veículo (círculos brancos).

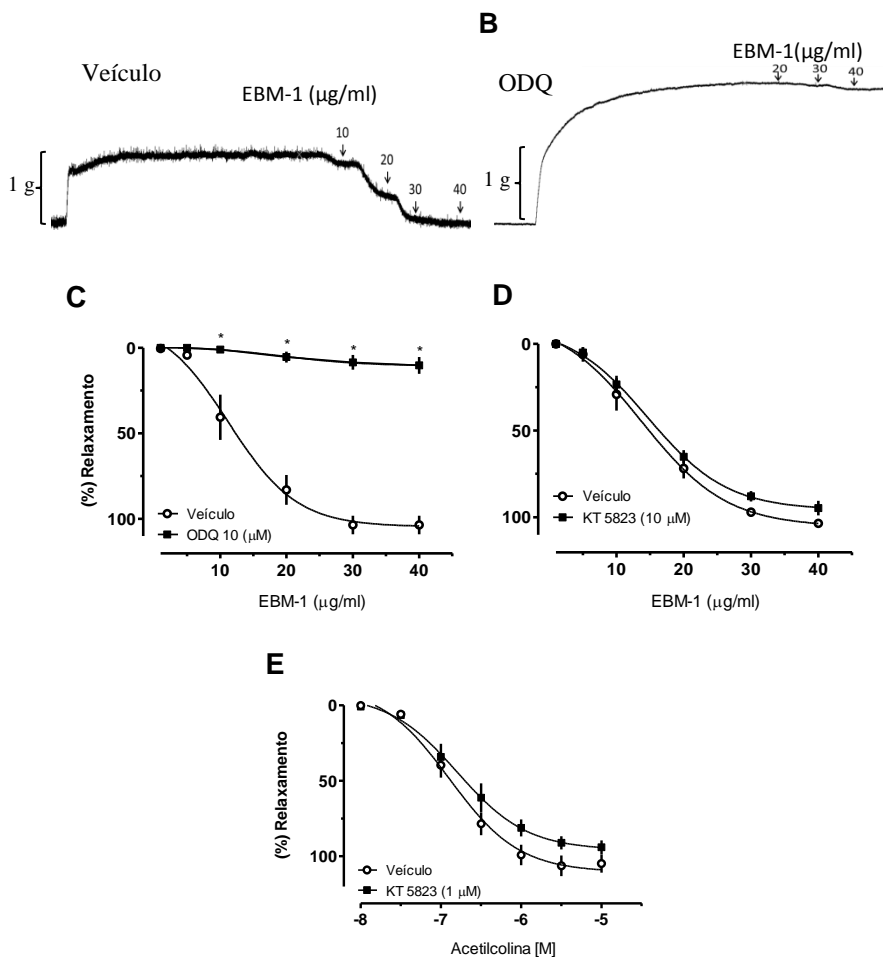


Figura 6: Envolvimento da enzima guanilato ciclase solúvel no relaxamento induzido pelo EBM-1 em anéis de aorta de rato. Preparações com endotélio funcional e pré-contraídas pela fenilefrina foram expostas às concentrações crescentes cumulativas do EBM-1 na presença de veículo (A), ODQ (B e C), ou de KT5823 (D). O painel E mostra a ausência de influência do KT5823 no efeito vasodilatador induzido pela acetilcolina. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (n de 4 a 7 preparações por grupo). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. * indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo veículo (círculos brancos).

4.3 Ausência de envolvimento de prostanóides e de receptores histamínicos e muscarínicos no efeito vasorelaxante do EBM-1

O inibidor não seletivo das ciclooxigenases (COXs), indometacina, não alterou o relaxamento vascular promovido pelo extrato EBM-1 em anéis aórticos de rato previamente contraídos por fenilefrina (Figura 7). Do mesmo modo que o antagonismo de receptores histamínicos pela pirilamina (Figura 8A), e o antagonismo de receptores muscarínicos pela atropina (Figura 8B), não impediram o relaxamento vascular causado pelo extrato EBM-1 em anéis de aorta de rato previamente contraídos por fenilefrina.

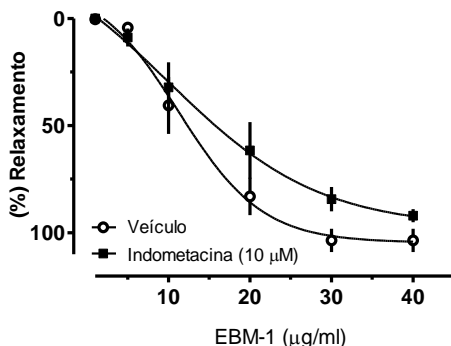


Figura 7: Inibição da ciclooxigenase (COX) não altera o relaxamento induzido pelo EBM-1. Resposta de anéis de aorta de rato contraídos por fenilefrina às concentrações crescentes e cumulativas do extrato EBM-1, em presença de indometacina. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (n de 5 a 6 preparações por grupo). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. * indica $p < 0.05$ em comparação ao grupo veículo (círculos brancos).

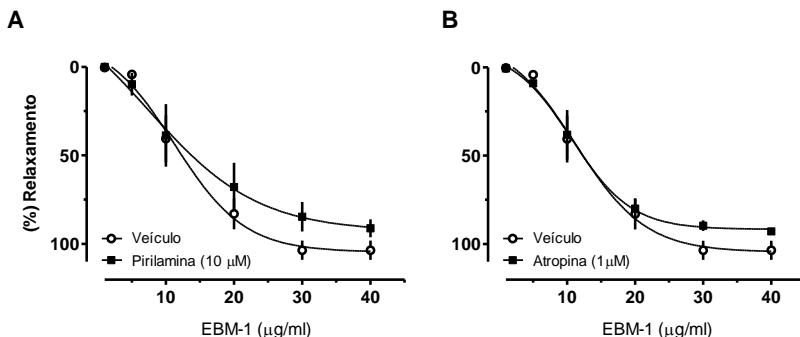


Figura 8: Antagonistas de receptores histamínicos e muscarínicos não alteram o relaxamento induzido pelo EBM-1. Anéis de aorta de rato com endotélio funcional foram expostos às concentrações crescentes e cumulativas do EBM-1 após incubação com o antagonista de receptores H1 da histamina, pirilamina (A), ou com o antagonista de receptores muscarínicos atropina (B). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (n de 4 a 6 preparações por grupo). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. * indica $p < 0.05$ em comparação ao grupo veículo (círculos brancos).

4.4 Contribuição de canais de K^+ no vasorrelaxamento de anéis de aorta induzido pelo EBM-1

O inibidor não seletivo de canais de K^+ ativados pelo Ca^{2+} ou por voltagem, TEA, reduziu o E_{max} de dilatação vascular gerado pelo EBM-1 de 104,7% (91,5-117,8%), para 69,05% (47,41 a 90,70%) (Figura 9A). Entretanto, a incubação das preparações com inibidores seletivos de canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de condutância baixa (apamina) ou alta (iberitoxina), assim como o bloqueador de canais de K^+ sensíveis ao ATP (glibenclamida), não foi capaz de alterar o relaxamento promovido pelo EBM-1 (Figuras 9B, 9C e 10A, respectivamente). Por outro lado, o relaxamento gerado por concentrações intermediárias do EBM-1 (10 e 20 µg/ml) foi reduzido na presença do bloqueador seletivo de canais de K^+ ativados por voltagem, 4-aminopiridina, quando comparada aos efeitos gerados pelo EBM-1 apenas na presença de veículo (Figura 10B). Deste modo, ocorreu a elevação da CE_{50} do EBM-1 de 9,1 (6,2-12,1) µg/ml para 15,6 (9,8-21,5) µg/ml, na ausência e presença de 4-aminopiridina, respectivamente.

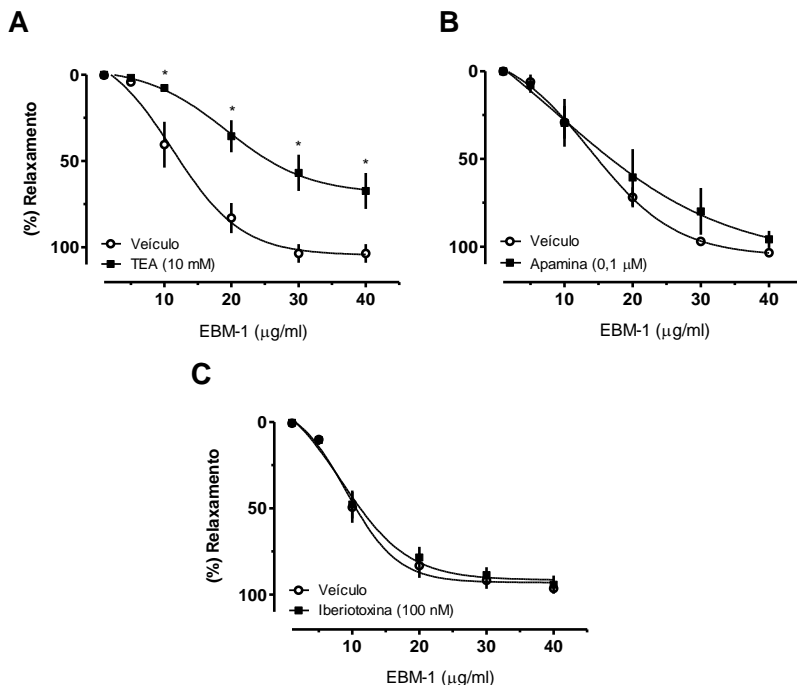


Figura 9: Efeito relaxante induzido pelo EBM-1 na presença de inibidores de canais de potássio ativados por cálcio. Anéis de aorta de rato com endotélio funcional, pré-contraídos pela fenilefrina, foram expostos às concentrações crescentes cumulativas do EBM-1 na presença de TEA (A), apamina (B), ou iberiotoxina (C). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (n de 6 a 9 preparações por grupo). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. * indica $p < 0.05$ em comparação ao grupo veículo (círculos brancos).

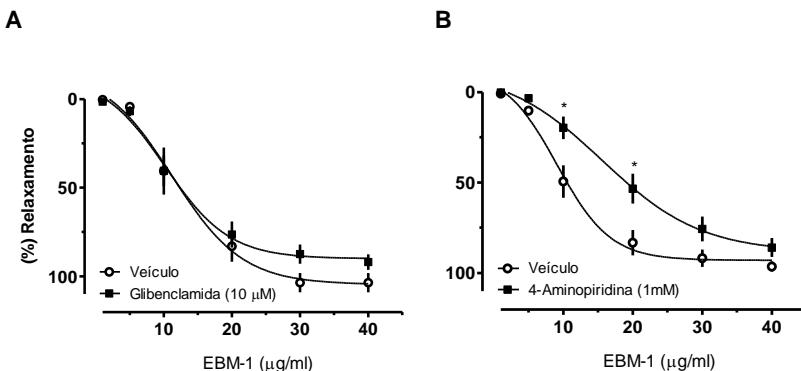


Figura 10: Efeito relaxante induzido pelo EBM-1 na presença de inibidores seletivos de canais de potássio sensíveis ao ATP ou ativados por voltagem. CCR do EBM-1 em anéis de aorta de rato pré-contraídos por fenilefrina com endotélio funcional na presença da glibenclâmida (A), ou 4-aminopiridina (B). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (n de 5 a 9 preparações por grupo). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. * indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo veículo (círculos brancos).

4.5 Participação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no efeito vasodilatador do EBM-1

O sequestrador de ânions superóxido tempol foi capaz de evitar parcialmente o relaxamento induzido pelo EBM-1, mesmo quando concentrações maiores do extrato (até 60 µg/ml) foram utilizadas – nesses experimentos o E_{\max} de vasodilatação induzida pelo EBM-1 foi reduzido de 100,6% (92,5-108,6%), nas preparações controle, para 73,9% (66,1-81,7%), nos vasos expostos ao tempol (Figura 11A). Por sua vez, a utilização de apocinina, uma droga comumente utilizada como inibidora do complexo enzimático NADPH oxidase, reduziu significativamente os efeitos da CCR do EBM-1 até a concentração de 40 µg/ml, mas não impediu o efeito vasodilatador quando concentrações superiores de EBM-1 (50 e 60 µg/ml) foram utilizadas (Figura 11B). Esta alteração provocou o aumento da CE_{50} do EBM-1 de 11,9 (4,5-19,5 µg/ml) para 19,7 (5,5-33,9 µg/ml), na ausência e presença da apocinina, respectivamente.

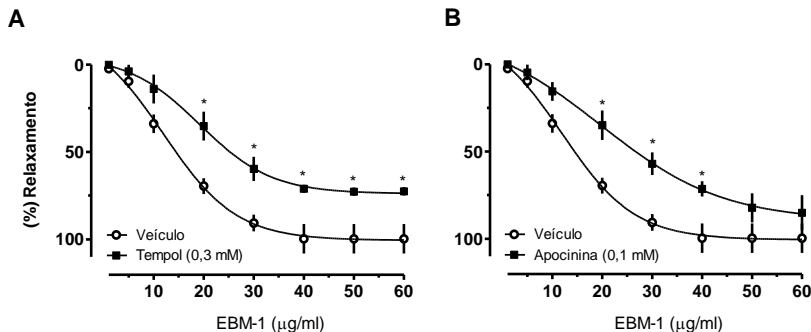


Figura 11: Participação de ROS na vasodilatação induzida pelo EBM-1. Resposta de anéis de aorta de rato previamente contraídos por fenilefrina às concentrações crescentes e cumulativas do EBM-1 na presença do tempol (A), ou apocinina (B). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (n de 5 a 7 preparações por grupo). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni. * indica $p < 0,05$ em comparação veículo (círculos brancos).

4.6 Participação da via PI3K/Akt/mTOR e da AMPK no relaxamento induzido pelo EBM-1 em anéis de aorta de rato

O inibidor de PI3K wortmanin inibiu o relaxamento induzido pelo EBM-1 (Figura 12C), reduzindo sua E_{\max} de 100,3% (91,5-109,1%) para 25,8% (21,8-29,8%), este mesmo efeito também pode ser observado nos registros típicos Figuras 12A e 12B. Por sua vez, a CCR de vasodilatação do EBM-1 na presença do inibidor da Akt 1/2 (Figura 12D) encontra-se mais a direita do gráfico quando comparada a CCR do EBM-1 na presença de veículo, o que aumentou a CE_{50} do EBM-1 de 13,3 (9,8-16,8 $\mu\text{g/ml}$) para 23,7 (17,4-29,9 $\mu\text{g/ml}$), na ausência e presença do inibidor, respectivamente. Por outro lado, o inibidor de Akt 1/2 não causou qualquer alteração no relaxamento induzido pela acetilcolina (Figura 12E). É interessante observar que a incubação dos anéis de aorta com 10 $\mu\text{l/ml}$ de DMSO, veículo utilizado para dissolver alguns inibidores como ser revisto no item 3.4, não gerou qualquer efeito na ação vasodilatadora do EBM-1 (Figura 12F).

O inibidor da proteína cinase dependente de AMP, dorsomorfina (Figura 13A), e a rapamicina (Figura 13B), um inibidor da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), não geraram nenhum efeito sobre o relaxamento vascular induzido pelo EBM-1 nos experimentos realizados.

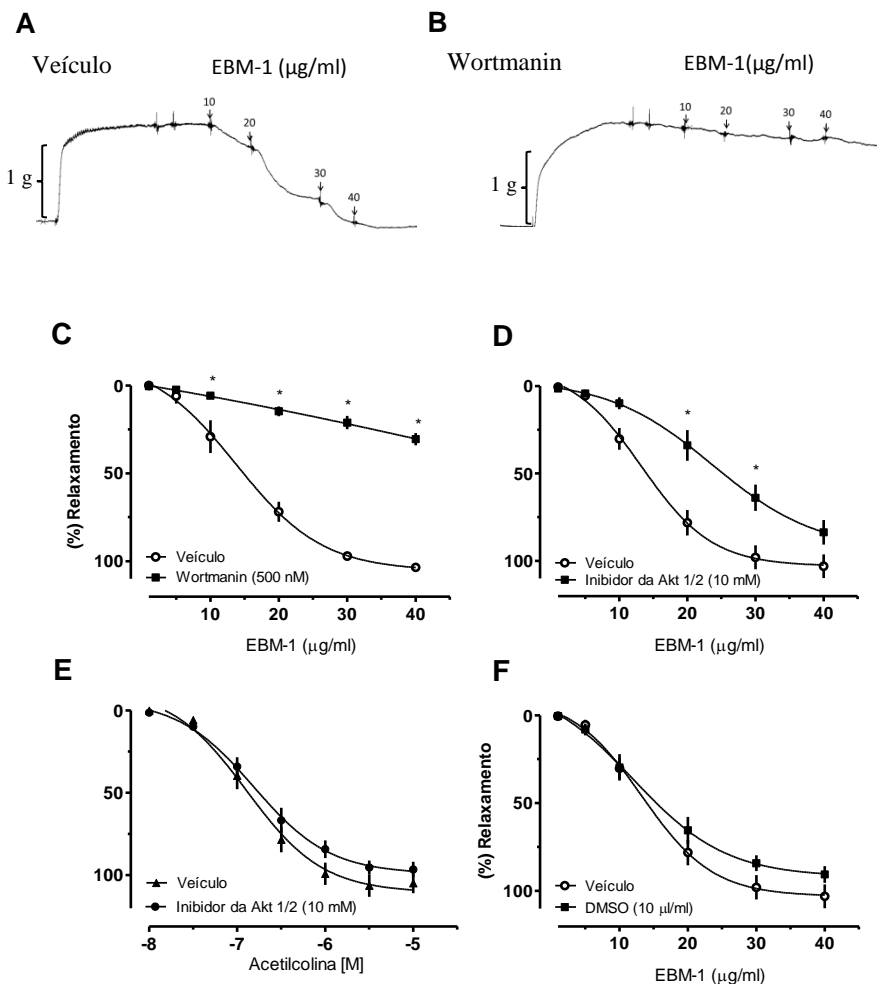


Figura 12: Participação da via PI3K/Akt no vasorrelaxamento induzido pelo EBM-1 em anéis de aorta de rato. Preparações com endotélio funcional e pré-contraídas por fenilefrina foram expostas às concentrações crescentes cumulativas do EBM-1 (A), na presença de wortmanin (B e C), inibidor da Akt 1/2 (D), DMSO (F). Em (E) as preparações de anéis aorta previamente contraídas por fenilefrina foram expostas à acetilcolina na presença do inibidor Akt 1/2. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (n de 4 a 7 preparações por grupo). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. * indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo veículo (círculos brancos).

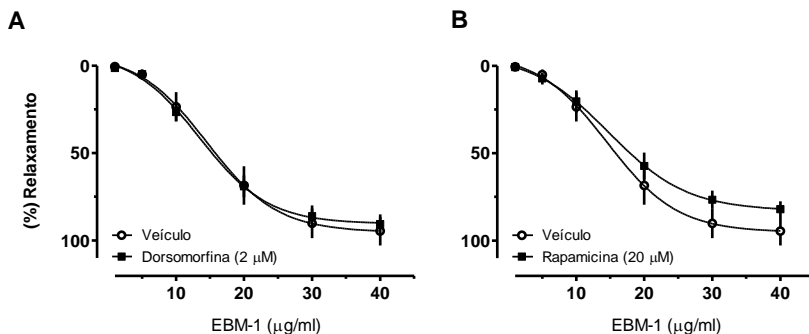


Figura 13: Inibidores da AMPK e mTOR não alteram o relaxamento em resposta ao EBM-1. Anéis de aorta de rato com endotélio funcional foram expostos às concentrações crescentes e cumulativas do EBM-1 na presença de dorsomorfina (A), ou rapamicina (B). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (n de 6 a 7 preparações por grupo). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. * indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo veículo (círculos brancos).

4.7 Avaliação de diferentes métodos de extração sobre o efeito vasorrelaxante

Com o objetivo de identificar se a alteração do método extrativo poderia alterar a potência ou eficácia do efeito vasorrelaxante foram construídas curvas cumulativas para os diversos extratos fornecidos pelo Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da UFSC. Pode-se observar que, apesar de também causarem um relaxamento total das preparações nas concentrações mais elevadas, o efeito vasodilatador das concentrações intermediárias (10 a 30 $\mu\text{g/ml}$) dos extratos EBM-3, EBHUP-2 e EBHUS-1, foi significativamente menor do que o gerado pelo EBM-1 (Figuras 14A, 14C e 14E, respectivamente). Essas diferenças podem ser confirmadas pela análise da CE_{50} conforme descrito na Tabela 1. Por outro lado, as curvas cumulativas dos extratos EBHUP-1, EBHUP-3 e EBHUS-2 não apresentaram diferenças no efeito vasodilatador quando comparadas com a CCR do EBM-1 como pode ser visualizado na Figuras 14B, 14D e 14F, e Tabela 1.

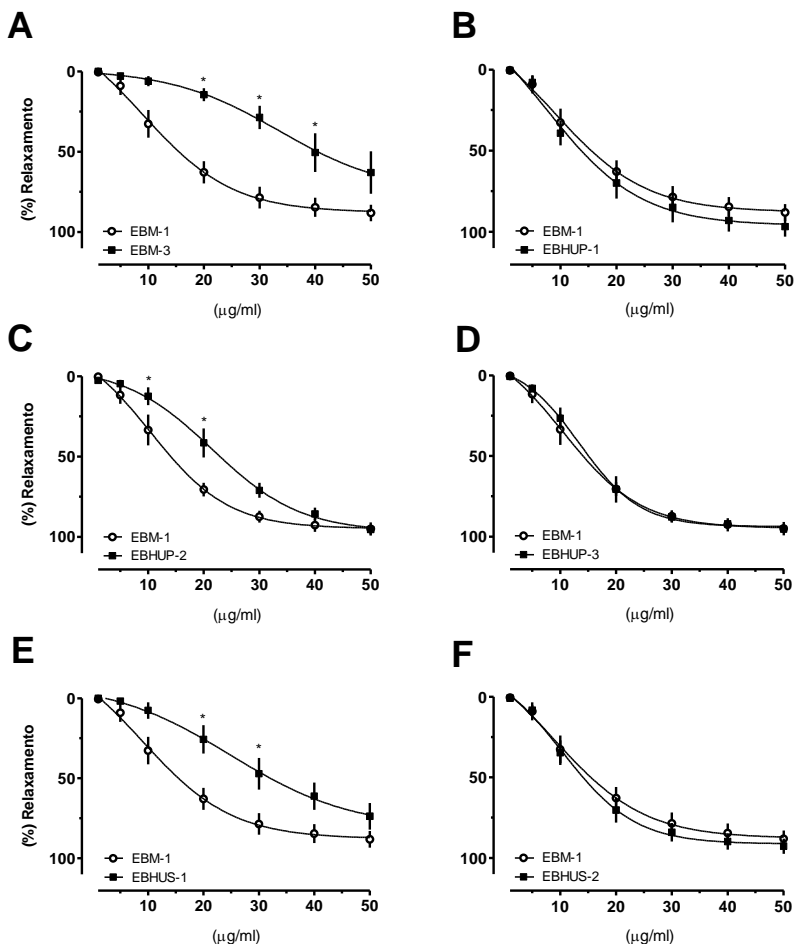


Figura 14: Avaliação do efeito vasorrelaxante de diferentes extratos obtidos das cascas do fruto da *Plinia peruviana*. Preparações de anéis de aorta com endotélio funcional previamente contraído por fenilefrina foram expostas às concentrações crescentes e cumulativas do EBM-3 (A), EBHUP-1 (B), EBHUP-2 (C), EBHUP-3 (D), EBHUS-1 (E) e EBHUS-2 (F) e comparadas a CCR do EBM-1. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (n de 5 a 8 preparações por grupo). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. * indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo EBM-1 (círculos brancos).

Tabela 1 Métodos de extração, efeito máximo relaxante (E_{\max}) e concentração efetiva 50% (CE_{50})

Extrato	E_{\max}	CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
EBM-1 ^a	94,8% (86,4-103,2)	9,0 (4,3-22,3)
EBM-2	93,2% (67,87-118,6)	20,2 (14,6-25,8)
EBM-3	62,9% (46,3-79,6)	33,5 (16,3-50,8)
EBHUP-1	96,2% (83,0-109,5)	10,1 (9,0-24,0)
EBHUP-2	96,9% (83,8-110)	21,4 (17,3-25,7)
EBHUP-3	93,8% (87,8-99,9)	13,4 (10,2-16,6)
EBHUS-1	67,5% (56,7-78,2)	24,9 (14,3-35,5)
EBHUS-2	91,4% (83,0-99,7)	10,4 (3,7-17,1)

^a mostra valores obtidos em um dos conjuntos de experimentos realizados com o EBM-1; os resultados exatos obtidos nos diferentes experimentos estão apresentados no Apêndice A.

5. DISCUSSÃO

Compostos vindos da flora apresentam vários benefícios em diferentes sistemas orgânicos entre eles o sistema cardiovascular. Tais compostos são conhecidos como compostos fitoquímicos, dentre os quais destacam-se os compostos polifenólicos, que incluem flavonoides e taninos, entre outros (Gonzalez *et al.*, 2011). Destes, os flavonoides possuem grande importância no sistema cardiovascular devido às ações como antioxidante (Vitor *et al.*, 2004), anti-hipertensiva (Gasparotto Junior *et al.*, 2011) e diurética (Gasparotto Junior *et al.*, 2012), por exemplo. Os benefícios gerados no sistema cardiovascular pelos polifenóis foi demonstrado com a utilização de resveratrol onde houve aumento e expressão e a atividade da óxido nítrico sintase endotelial (Wallerath *et al.*, 2002). Efeito protetor da disfunção endotelial similar, foi visto com a utilização da quercetina em animais naturalmente hipertensos, os quais apresentaram aumento da atividade da eNOS (Sanchez *et al.*, 2006). Deste modo, pelo menos alguns flavonoides favorecem a função da eNOS e a produção de NO em condições basais (Gonzalez *et al.*, 2011).

Em nosso trabalho verificamos que os extratos brutos das cascas do fruto da *Plinia peruviana* obtidos por micro-ondas rotaevaporado (EBM-1) e não rotaevaporado (EBM-2), apresentaram efeito vasorrelaxante em anéis de aorta de ratos mantidos em cubas de órgão isolado. Este efeito foi abolido após a remoção mecânica do endotélio funcional, sugerindo que ambos os extratos possuem atividade totalmente mediada pelo endotélio, (Figuras 3A e 3B). No entanto, ao comparar as concentrações necessárias para atingir a 50% de relaxamento (CE_{50}) de ambos os extratos, verificamos que o EBM-1 necessitou de quantidades menores para atingir este parâmetro, sugerindo que EBM-1 apresenta maior potência quando comparado com EBM-2 (Figura 4). Com base nestes resultados, o EBM-1 foi escolhido para investigação do mecanismo de ação responsável pelo vasorrelaxamento encontrado em nosso estudo.

Sabe-se que as células endoteliais influenciam no tônus vascular, através da liberação de diversas substâncias vasoativas, as quais promovem o relaxamento ou a contração do músculo liso vascular. A principal substância derivada do endotélio com efeito vasorrelaxante é o óxido nítrico. O óxido nítrico se difunde para o músculo liso vascular onde ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (Ignarro *et al.*, 1987), esta enzima, por sua vez, converte o nucleotídeo GTP em GMPc (Arnold *et al.*, 1977), como mencionado de forma mais detalhada no item 1.2. Os

achados de nosso trabalho revelam que a presença do inibidor não seletivo das óxido nítrico sintases (L-NAME) promoveu a inibição do relaxamento induzido pelo EBM-1, o que vai ao encontro do efeito observado na presença do sequestrador de NO (carboxi-PTIO), ou com a incubação do inibidor da guanilato ciclase (ODQ), ou seja, uma drástica redução do efeito máximo relaxante de EBM-1 (Figuras 5C, 5E e 6C respectivamente). Com base nestes resultados sugere-se que a ativação da via NO/GCs é essencial para o vasorrelaxamento gerado pelo EBM-1. Entretanto, na presença do inibidor da PKG (KT5823) não houve redução no relaxamento induzido pelo EBM-1 e tampouco no relaxamento mediado pela acetilcolina na concentração de 1 μM (Figuras 6D e 6E). Segundo dados da literatura a concentração de 1 μM de KT5823 (a mesma concentração usada em parte dos nossos experimentos), foi suficiente para inibir a PKG e para bloquear a captação de K^+ através de canais de K^+ em resposta ao nitroprussiato de sódio, um doador de NO, em anéis de aorta de rato sem endotélio funcional (Palacios *et al.*, 2013). Por outro lado, em experimentos de Van Der Zyppe e Majewski 10 μM de KT5823 falhou em inibir o relaxamento induzido por ambos os análogos do GMPc, CPTcGMP e PETcGMP, além de não afetar a resposta vasodilatadora gerada pelo do SNP e apresentar um pequeno efeito inibitório sobre a resposta vasodilatadora ao gliceriltrinitrato (GTN), sendo que ambos atuam através de GMPc (Van Der Zyppe *et al.*, 1998). Apesar de não termos explorado a ausência de efeitos do KT5823 em nosso estudo, e mesmo considerando publicações anteriores no qual o mesmo não mostrou-se ativo em preparações vasculares, consideramos pouco provável que a falta de efeito do KT5823 seja devido à ausência da participação da PKG no vasorrelaxamento. A falta de eficácia do inibidor da PKG em nossos experimentos poderia estar, por exemplo, associada à baixa capacidade de atingir seu alvo em nossas condições experimentais. Novos experimentos são necessários para esclarecer este achado como, por exemplo, a dosagem de GMPc nas cubas de órgão isolados, entre outros.

O óxido nítrico sintetizado pode modular diretamente diversas estruturas, entre elas, as COXs, influenciando a biossíntese de prostaglandinas (Salvemini *et al.*, 1993; Mollace *et al.*, 2005). Entre as prostaglandinas descritas no sistema vascular destaca-se a PGI_2 , a qual atua em receptores chamados IP acoplados a proteína G_s e enzima adenilato ciclase. A ativação desse receptor eleva os níveis de AMPc intracelular que, nas células reduz a atividade da cinase de cadeia leve de miosina (MLCK), e assim promovendo o relaxamento do músculo

liso vascular (Birukova *et al.*, 2007). Embora nossos resultados demonstrem a participação efetiva do NO no relaxamento mediado pelo extrato EBM-1, não houve alteração significativa do efeito vasorrelaxamento deste extrato na presença do inibidor não seletivo das ciclooxigenases, indometacina (Figura 7), sugerindo que a PGI_2 não participa do relaxamento mediado pelo extrato EBM-1.

Receptores muscarínicos e histamínicos estão presentes na membrana das células endoteliais e são ativados por seus ligantes endógenos a acetilcolina e a histamina. A ativação destes receptores induz a produção e liberação do NO pelas células endoteliais (Van De Voorde *et al.*, 1983), o qual promove o relaxamento, como descrito anteriormente. Em nossos experimentos, a presença dos antagonistas de receptores muscarínicos (atropina) e o antagonista de receptores H1 da histamina a pirilamina não alteraram o relaxamento mediado pelo extrato EBM-1, indicando ausência da participação destes receptores no vasorrelaxamento induzido por EBM-1 (Figuras 8A e 8B).

Tendo em vista a importância de canais de K^+ no controle do tônus vascular, o envolvimento da via do NO/guanilato ciclase no relaxamento induzido por EBM-1, e sabendo que a via acima citada pode modular a atividades destes canais, investigamos a participação dos mesmos no relaxamento induzido pelo EBM-1 em anéis de aorta de rato. Neste estudo, verificamos que há participação de canais de K^+ na indução do relaxamento de EBM-1, pois a incubação com o inibidor não seletivo de canais de K^+ ativados pelo Ca^{2+} ou por voltagem, TEA (Feletou, 2009; Ko *et al.*, 2010), reduziu o efeito máximo vasodilatador do EBM-1 (Figura 9A). De modo semelhante, o efeito induzido pelo EBM-1 foi reduzido na presença do inibidor seletivo de canais de K^+ ativados por voltagem 4-aminopiridina (Cox, 2005; Ko *et al.*, 2010) nas concentrações menores de EBM-1 Figura 9B, com aumento da CE_{50} , revelando que foram necessárias quantidades maiores do EBM-1 para o início do relaxamento, quando os canais K_v estavam inibidos, apesar do efeito máximo ter sido alcançado. Com base nestes resultados sugere-se que a ativação de canais de K^+ , principalmente os ativados por voltagem, estão envolvidos, ao menos em parte do no relaxamento vascular induzido pelo EBM-1 em anéis de aorta de rato. Entretanto, na presença dos inibidores seletivos de canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de condutância baixa (apamina) (Nelson e Quayle, 1995; Coleman *et al.*, 2004) ou alta (iberiotoxina), assim como do bloqueador de canais de K^+ sensíveis ao ATP (glibenclâmida) o efeito vasorrelaxante induzido por EBM-1 em anéis de aorta de rato não foi alterado (Figuras 9B, 9C e 10^a

respectivamente), indicando a ausência da participação destes canais de K^+ .

Como descrito no início desta seção, extratos de plantas são compostos por diferentes tipos de substâncias, entre elas os compostos polifenólicos, cuja função está amplamente associada a efeitos antioxidantes em diversos sistemas biológicos, incluindo o sistema cardiovascular. Por outro lado o endotélio vascular, músculo liso vascular e fibroblastos são locais de intensos processos de oxidação-redução, que resultam em espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (Touyz *et al.*, 2011). Reações de sinalização desencadeadas por ROS podem resultar em dilatação vascular, como por exemplo, os efeitos mediados pelo H_2O_2 , as quais incluem a ativação da PI3K, NOS, canais K_v , guanilato ciclase, ativação de canais K_{Ca} de condutância alta através da PKG ou de maneira direta (Durand e Gutterman, 2013). Além disso, dependendo do estado nativo e do tipo de ROS envolvida, as ROS podem desencadear a sinalização redox por meio de reações de oxidação ou redução de moléculas como ácidos graxos e proteínas, resultando em alterações de solubilidade, atividade ou ligação (Brandes *et al.*, 2014). Por estas razões, avaliamos a influência de espécies reativas de oxigênio na vasodilatação induzida pelo EBM-1. De maneira interessante, observamos que a exposição ao sequestrador de ânions $O_2^{\cdot-}$ tempol, reduziu o efeito máximo relaxante induzido pelo EBM-1, e que concentrações intermediárias do EBM-1 tiveram a capacidade de relaxar os anéis de aorta significativamente diminuída na presença do inibidor da NADPH oxidase ou sequestrador de ROS apocinina (Figuras 11A e 11B). Nossos resultados sugerem a formação de ROS, e possivelmente a regulação do estado redox de componentes intracelulares, é fundamental para o efeito vasorrelaxante induzido pelo extrato EBM-1. Resultados semelhantes foram encontrados em extratos de uva, onde houve a formação de ROS nas células endoteliais desencadeou a sinalização redox resultando na fosforilação da eNOS (Madeira *et al.*, 2009).

Com base nestes dados, levantamos a hipótese de que a via PI3K/Akt, cuja atividade é particularmente influenciada pelo estado redox, e que uma vez ativada pode estimular a produção de NO pela eNOS, poderia ter a atividade influenciada pelo EBM-1 e contribui para o relaxamento vascular. Em nossos resultados evidenciamos que a presença do inibidor da PI3K (wortmanin) inibiu efeito vasorrelaxante induzido pelo EBM-1 (Figura 12C), demonstrado também nos registros típicos Figuras 12A e 12B. E de forma semelhante a presença do inibidor da Akt alterou a CCR de vasodilatação induzida pelo EBM-1, aumentando sua CE_{50} (Figura 12D). No entanto, a presença do inibidor

de uma das cinases responsáveis pela continuidade da cascata de sinalização da PI3K/Akt a mTORC-1 (rapamicina) não alterou o efeito vasodilatador induzido pelo EBM-1 (Figura 13B). Estes nossos achados vão ao encontro de resultados apresentados por polifenóis do vinho tinto e suco de uva que promoveram relaxamento de artérias coronárias por meio da ativação da via Src/PI3K/Akt/NOS de modo dependente da sensibilização redox (Ndiaye *et al.*, 2005; Anselm *et al.*, 2007). Desta forma, podemos sugerir que o efeito vasodilatador induzido por EBM-1 se deve, pelo menos em parte, a ativação da via PI3K/Akt/NOS, e pode-se especular que esta ativação possa ser desencadeada pela ativação do potencial redox de espécies reativas como o ânion superóxido. O mecanismo exato envolvido nesse processo permanece por ser elucidado.

Além dos alvos citados acima, já foi mostrado que compostos polifenólicos podem atuar sobre a AMPK. A cascata de sinalização da AMPK possui um papel importante na prevenção de doenças, pois a AMPK inibe o acúmulo de gorduras e reduz a síntese de colesterol (Zang *et al.*, 2006). O resveratrol e a quercetina são exemplos de polifenóis que atuam ativando esta via, com efeitos de prevenção no desenvolvimento de hiperlipidemia e aterosclerose em camundongos diabéticos para ativação via resvetrol, enquanto que ativação por meio da quercetina está relacionada ao aumento da resistência de neurônios a doenças relacionadas a idade (Andriantsitohaina *et al.*, 2012). Uma das sinalizações desencadeadas pela ativação da AMPK é fosforilação e ativação da eNOS; como mostrado em estudos que revelam que a ativação da AMPK em células progenitoras endoteliais (EPCs) ocasionou um aumento da biodisponibilidade de NO (Li *et al.*, 2008), ou mesmo o aumento da expressão da eNOS por meio da metformina (Kanazawa *et al.*, 2008). A metformina é um fármaco utilizado na clínica para o tratamento do diabetes Mellitus tipo II, onde causa o aumento do AMP inibindo diretamente a enzima gliconeogênica frutose 1,6 bifosfato, e este mesmo aumento do AMP é responsável pela ativação da AMPK (Hardie *et al.*, 2012). No entanto, em nossos experimentos não houve alteração do relaxamento induzido pelo EBM-1 na presença do inibidor da AMPK dorsomorfina, sugerindo ausência de participação desta via no relaxamento induzido pelo EBM-1 (Figura 11A).

Em nosso trabalho testamos diferentes preparações da *Plinia peruviana*, obtidas por diferentes métodos de extração (Figura 14), sendo que todos os extratos testados geraram relaxamento dos anéis de aorta e, de fato, todos os extratos possuem quantidades significativas de

compostos fenólicos (Anexos A, B e C). Apesar desta correlação, nossos resultados não permitem afirmar que os polifenóis são responsáveis pela ação vasodilatadora destes extratos.

De maneira resumida, os achados deste trabalho comprovaram nossa hipótese inicial, pois revelaram que as cascas do fruto da *Plinia peruviana* possuem componentes com atividade vasodilatadora, ao menos quando extratos obtidos por diferentes métodos de extração foram avaliados *in vitro*. A Figura 15 mostra um esquema no qual, a partir dos resultados obtidos em nosso trabalho, os mecanismos envolvidos na ação vasodilatadora do EBM-1 estão ilustrados. O extrato EBM-1 promove vasorrelaxamento de anéis de aorta de rato de modo totalmente dependente do endotélio vascular. Este mecanismo independe da ativação de receptores muscarínicos e histamínicos, ou mesmo da ativação das ciclooxigenases, da mTOR ou da AMPK. Por outro lado, esse efeito é decorrente da ativação da via NO/GCs e parece envolver uma regulação da produção ou biodisponibilidade de espécies reativas, como o superóxido, bem como da abertura de canais de K^+ ativados por voltagem. Além disso, nossos resultados mostram que a ativação da PI3K possui um papel importante neste efeito vasodilatador, pelo menos em parte por meio da Akt.

A ativação da via PI3K/Akt/NOS para o tratamento de doenças cardiovasculares não é muito explorado farmacologicamente, tendo em vista que nenhum fármaco comercializado para o tratamento de doenças como a hipertensão, angina e aterosclerose atua sobre esta via até o momento. Desta forma os achados deste trabalho abrem caminho para estudos complementares que avaliem a influência destes extratos sobre o sistema cardiovascular de animais saudáveis ou com doenças cardiovasculares por meio de experimentos *in vivo*. Além de possibilitar a determinação dos principais compostos e biomarcadores contidos nestes extratos bem como, a identificação de características farmacocinéticas e estudos de toxicidade. Este estudo também possibilita um melhor aproveitamento das cascas dos frutos da jabuticaba (*Plinia peruviana*) cujo destino rotineiramente é o descarte ou subutilização, com beneficiamento e agregação de valor a um produto tipicamente brasileiro. Além disso, ativação da via PI3K/Akt pelo EBM-1 pode ser importante não apenas no controle do tônus vascular, mas também para o tratamento de doenças relacionadas ao metabolismo, angiogênese, síntese proteica, crescimento, proliferação e sobrevivência celular, tendo em vista que tais ações podem ser moduladas pela PI3K/Akt.

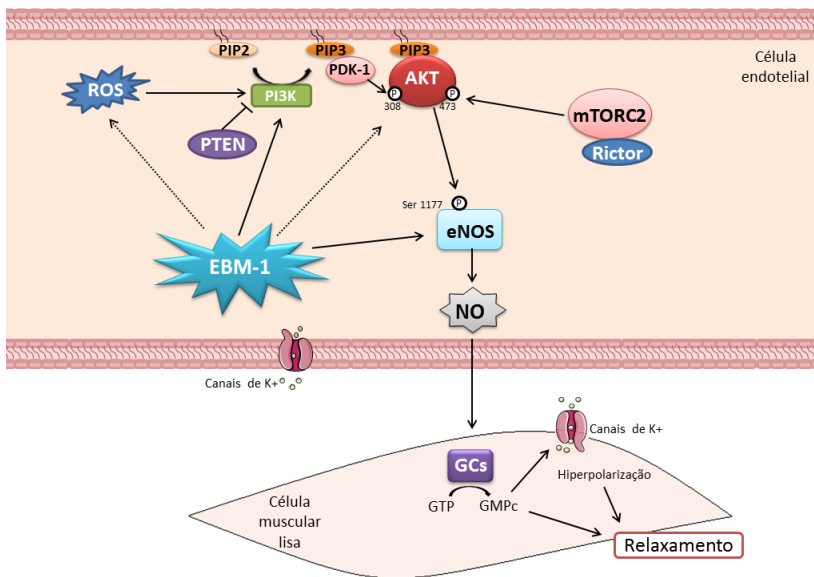


Figura 15: Eventos potencialmente envolvidos no relaxamento vascular de anéis de aorta de rato induzido pelo EBM-1. Com base nos nossos achados, lançamos a hipótese de que o EBM-1 altera o potencial redox intracelular, o que contribui ao menos em parte na sua capacidade de ativar a PI3K. A PI3K promove a formação do PIP3, o qual recruta a PDK-1 e a Akt para a membrana, onde a PDK-1 ativa a Akt. A Akt, por sua vez, fosforila a Ser 1177 da eNOS, que então inicia a produção de NO, o qual se difunde para células musculares lisas e ativa a guanilato ciclase solúvel, desencadeando o relaxamento vascular (linhas tracejadas que partem do EBM-1 identificam componentes intracelulares envolvidos, ao menos em parte, com o efeito vasodilatador gerado pelo EBM-1). Akt = proteína quinase B; EBM-1 = extrato hidroalcoólico bruto preparado a partir das cascas do fruto da *Plinia* peruviiana, obtidos pelo método de extração assistida por micro-ondas e rotaevaporação; GCS = Guanilato ciclase solúvel; GMPc = monofosfato cíclico de guanosina; GTP = trifosfato de guanosina; ; mTORC-2- Proteína alvo da rapamicina em mamíferos complexo 2; NO = óxido nítrico; PDK-1 = Proteína quinase dependente de fosfatidilinositide-3; PI3K = fosfatidilinosital 3-quinase; ROS = espécies reativas de oxigênio

6. CONCLUSÕES

Com os resultados que obtivemos na execução desta pesquisa, podemos sugerir que:

- Os EBM, possuem substâncias ativas que promovem o relaxamento vascular de anéis de aorta, de modo dependente do endotélio;
- O extrato hidroalcoólico bruto da casca do fruto da *Plinia peruviana*, obtido por extração assistida em micro-ondas e rotaevaporado (EBM-1), possui maior eficiência no vasorrelaxamento do que o extrato que não passou por rotaevaporação (EBM-2);
- O relaxamento dependente de endotélio induzido pelo EBM-1 envolve a produção de NO e a ativação da GCs;
- Os prostanóides formados pela enzima ciclooxigenase não participam do relaxamento induzido pelo EBM-1;
- O relaxamento induzido pelo EBM-1 independe de ativação de receptores histamínicos (subtipo H1), e muscarínicos;
- A ativação de canais de K^+ , em especial os canais de K^+ ativados por voltagem, parece estar envolvida no efeito vasorrelaxante desencadeado pelo EBM-1;
- Espécies reativas de oxigênio parecem estar envolvidas no mecanismo de vasorrelaxamento induzido pelo EBM-1, por meio da regulação da sua produção ou biodisponibilidade;
- O relaxamento vascular induzido pelo EBM-1 envolve a ativação da PI3K e, pelo menos em parte, da Akt, cuja ativação pode estimular a produção de NO e consequentemente promover o relaxamento vascular. Entretanto, sem envolver a participação da mTOR ou AMPK;
- O método de extração não alterou o efeito máximo do relaxamento induzido pelos extratos quando comparados ao EBM-1, mesmo apresentando concentrações diferentes de compostos fenólicos totais.

Os resultados obtidos neste trabalho revelam que as cascas do fruto da *plinia peruviana* apresentam componentes capazes de causar relaxamento vascular *in vitro* totalmente dependente do endotélio. Embora não tenhamos identificado um receptor que medeia este efeito vasorrelaxante evidenciamos que este efeito é decorrente da ativação das vias do óxido nítrico/guanilato ciclase e, pelo menos em parte, da PI3K/Akt. Também parece envolver uma regulação da produção ou

biodisponibilidade de espécies reativas de oxigênio, bem como da abertura de canais de K^+ ativados por voltagem.

REFERÊNCIAS

- AKROUH, A. et al. Molecular biology of K(ATP) channels and implications for health and disease. *IUBMB Life*, v. 61, n. 10, p. 971-978, 2009.
- ALEXANDER, S. P. et al. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: ion channels. *Br J Pharmacol*, v. 170, n. 8, p. 1607-1651, 2013.
- ANDJELKOVIC, M. et al. Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, n. 12, p. 5699-5704, 1996.
- ANDRIANTSITOHAINA, R. et al. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *Br J Nutr*, v. 108, n. 9, p. 1532-1549, 2012.
- ANSELM, E. et al. Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS. *Cardiovasc Res*, v. 73, n. 2, p. 404-413, 2007.
- ARAUJO, C. R. et al. Myrciaria cauliflora peel flour had a hypolipidemic effect in rats fed a moderately high-fat diet. *J Med Food*, v. 17, n. 2, p. 262-267, 2014.
- ARNOLD, W. P. et al. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 74, n. 8, p. 3203-3207, 1977.
- BATTLE, T. et al. Selective isolation of rat aortic wall layers and their cell types in culture—Application to converting enzyme activity measurement. *Tissue and Cell*, v. 26, n. 6, p. 943-955, 1994.
- BHATT, A. P.; DAMANIA, B. AKTivation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway by KSHV. *Front Immunol*, v. 3, p. 1-16, 2012.
- BICHET, D.; HAASS, F. A.; JAN, L. Y. Merging functional studies with structures of inward-rectifier K(+) channels. *Nat Rev Neurosci*, v. 4, n. 12, p. 957-967, 2003.

BIRUKOVA, A. A. et al. Prostaglandins PGE(2) and PGI(2) promote endothelial barrier enhancement via PKA- and Epac1/Rap1-dependent Rac activation. *Exp Cell Res*, v. 313, n. 11, p. 2504-2520, 2007.

BRAGULAT, E. et al. Endothelial dysfunction in salt-sensitive essential hypertension. *Hypertension*, v. 37, n. 2 Pt 2, p. 444-448, 2001.

BRANDES, R. P.; WEISSMANN, N.; SCHRÖDER, K. Redox-mediated signal transduction by cardiovascular Nox NADPH oxidases. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 73, p. 70-79, 2014.

BRETÓN-ROMERO, R.; LAMAS, S. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox Biology*, v. 2, p. 529-534, 2014.

BROGNARD, J. et al. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell*, v. 25, n. 6, p. 917-931, 2007.

BROWN, D. I.; GRIENDLING, K. K. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circ Res*, v. 116, n. 3, p. 531-549, 2015.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciência e Cultura*, v. 55, p. 37-39, 2003.

CARVALHO-DE-SOUZA, J. L. et al. BK Channels in Cardiovascular Diseases and Aging. *Aging Dis*, v. 4, n. 1, p. 38-49, 2013.

CARVALHO, M. C.; MIRANDA, D. L. As exportações Brasileiras de frutas: um panorama atual. . Brasília, Grupo de Pesquisa comércio Internacional, 2013.

CHAVASCO, J. M. et al. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from southern Minas Gerais cerrado. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 56, n. 1, p. 13-20, 2014.

CHIEN, S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. 2007. H1209-H1224.

COLEMAN, H. A.; TARE, M.; PARKINGTON, H. C. Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the

regulation of vascular tone in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 31, n. 9, p. 641-649, 2004.

COX, R. H. Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle. *Cell Biochem Biophys*, v. 42, n. 2, p. 167-195, 2005.

DANNER, M. A.; AL., E. Armazenamento a vácuo prolonga a viabilidade de sementes de Jabuticabeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n. 1, p. 246-252, 2010.

DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*, v. 115, n. 10, p. 1285-1295, 2007.

DI CRISTOFANO, A.; PANDOLFI, P. P. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell*, v. 100, n. 4, p. 387-390, 2000.

DOMIN, J. et al. Cloning of a human phosphoinositide 3-kinase with a C2 domain that displays reduced sensitivity to the inhibitor wortmannin. *Biochem J*, v. 326 (Pt 1), p. 139-147, 1997.

DURAND, M. J.; GUTTERMAN, D. D. Diversity in mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in health and disease. *Microcirculation*, v. 20, n. 3, p. 239-247, 2013.

EDWARDS, G.; FELETOU, M.; WESTON, A. H. Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. *Pflugers Arch*, v. 459, n. 6, p. 863-879, 2010.

ENGELMAN, J. A.; LUO, J.; CANTLEY, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*, v. 7, n. 8, p. 606-619, 2006.

FELETOU, M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br J Pharmacol*, v. 156, n. 4, p. 545-562, 2009.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 26, n. 6, p. 1215-1225, 2006.

FISSLTHALER, B.; FLEMING, I. Activation and signaling by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circ Res*, v. 105, n. 2, p. 114-127, 2009.

FORSTERMANN, U.; MUNZEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*, v. 113, n. 13, p. 1708-1714, 2006.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, v. 33, n. 7, p. 829-837, 2012.

FORTES, G. A. C. et al. Assessment of a maturity index in jabuticaba fruit by the evaluation of phenolic compounds, essential oil components, sugar content and total acidity. *American Journal of Food Technology*, v. 6, n. 11, p. 974-984, 2011.

GAO, Y.; MOTEN, A.; LIN, H.-K. Akt: a new activation mechanism. *Cell Res*, v. 24, n. 7, p. 785-786, 2014.

GARLAND, C. J.; DORA, K. A. Evidence against C-type natriuretic peptide as an arterial 'EDHF'. *Br J Pharmacol*, v. 153, n. 1, p. 4-5, 2008.

GASPAROTTO JUNIOR, A. et al. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. *J Ethnopharmacol*, v. 134, n. 2, p. 363-372, 2011.

GASPAROTTO JUNIOR, A. et al. Mechanisms underlying the diuretic effects of *Tropaeolum majus* L. extracts and its main component isoquercitrin. *J Ethnopharmacol*, v. 141, n. 1, p. 501-509, 2012.

GIELIS, J. F. et al. Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 50, n. 7, p. 765-776, 2011.

GONZALEZ, R. et al. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit Rev Food Sci Nutr*, v. 51, n. 4, p. 331-362, 2011.

HARDIE, D. G.; ROSS, F. A.; HAWLEY, S. A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 13, n. 4, p. 251-262, 2012.

HEMMINGS, B. A.; RESTUCCIA, D. F. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v. 4, n. 9, p. 1-3, 2012.

HIBINO, H. et al. Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiol Rev*, v. 90, n. 1, p. 291-366, 2010.

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, 1987.

JACINTO, E. et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*, v. 6, n. 11, p. 1122-1128, 2004.

KANAZAWA, I. et al. Metformin enhances the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells via AMP kinase activation as well as eNOS and BMP-2 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 375, n. 3, p. 414-419, 2008.

KATZ, M.; AMIT, I.; YARDEN, Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1773, n. 8, p. 1161-1176, 2007.

KO, E. A. et al. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res*, v. 44, n. 2, p. 65-81, 2008.

KO, E. A. et al. Pathophysiology of voltage-gated K⁺ channels in vascular smooth muscle cells: Modulation by protein kinases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 103, n. 1, p. 95-101, 2010.

KOOIMAN, K.; VAN DER STEEN, A. F.; DE JONG, N. Role of intracellular calcium and reactive oxygen species in microbubble-mediated alterations of endothelial layer permeability. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, v. 60, n. 9, p. 1811-1815, 2013.

LAGO, J. H. et al. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of Myrtaceae - *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. *Molecules*, v. 16, n. 12, p. 9827-9837, 2011.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, v. 149, n. 2, p. 274-293, 2012.

LI, C. et al. Activation of myocardial phosphoinositide-3-kinase p110 α ameliorates cardiac dysfunction and improves survival in polymicrobial sepsis. *PLoS One*, v. 7, n. 9, p. e44712, 2012.

LI, X. et al. AMP-activated protein kinase promotes the differentiation of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 28, n. 10, p. 1789-1795, 2008.

LIU, P. et al. Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus. *Nature*, v. 508, n. 7497, p. 541-545, 2014.

LIU, P. et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, v. 8, n. 8, p. 627-644, 2009.

LOBO DE ANDRADE, D. M. et al. Vasorelaxant and Hypotensive Effects of Jaboticaba Fruit (*Myrciaria cauliflora*) Extract in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, v. 2015, p. 1-8, 2015.

LUCAS, K. A. et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev*, v. 52, n. 3, p. 375-414, 2000.

MACEDO, E. V.; GEMAL, A. L. A produção de Fitomedicamentos e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. *Rev. Bras. Farm*, v. 90, n. 4, p. 290-297, 2009.

MADEIRA, S. V. et al. eNOS activation induced by a polyphenol-rich grape skin extract in porcine coronary arteries. *J Vasc Res*, v. 46, n. 5, p. 406-16, 2009.

MI, S. et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*, v. 403, n. 6771, p. 785-789, 2000.

MOLDOVAN, L. et al. Reactive oxygen species in vascular endothelial cell motility. Roles of NAD(P)H oxidase and Rac1. *Cardiovasc Res*, v. 71, n. 2, p. 236-246, 2006.

MOLLACE, V. et al. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev*, v. 57, n. 2, p. 217-252, 2005.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research. *Antioxid Redox Signal*, v. 20, n. 1, p. 164-182, 2014.

MORELLO, F.; PERINO, A.; HIRSCH, E. Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. *Cardiovasc Res*, v. 82, n. 2, p. 261-271, 2009.

NAKAGAWA, O. et al. Molecular cloning of human prostacyclin receptor cDNA and its gene expression in the cardiovascular system. *Circulation*, v. 90, n. 4, p. 1643-1647, 1994.

NDIAYE, M. et al. Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. *Faseb j*, v. 19, n. 3, p. 455-457, 2005.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*, v. 268, n. 4 Pt 1, p. C799-822, 1995.

OPARIL, S.; SCHMIEDER, R. E. New approaches in the treatment of hypertension. *Circ Res*, v. 116, n. 6, p. 1074-1095, 2015.

OSAKI, M.; OSHIMURA, M.; ITO, H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, v. 9, n. 6, p. 667-676, 2004.

OZKOR, M. A.; QUYYUMI, A. A. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular function. *Cardiol Res Pract*, v. 2011, p. 1-12, 2011.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

PALACIOS, J. et al. Effect of phenylephrine and endothelium on vasomotion in rat aorta involves potassium uptake. *J Physiol Sci*, v. 63, n. 2, p. 103-111, 2013.

RANDHIR, R.; SHETTY, P.; SHETTY, K. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry*, v. 37, n. 11, p. 1247-1256, 2002.

SACCHET, C. et al. Antidepressant-Like and Antioxidant Effects of *Plinia trunciflora* in Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, p. 1-9, 2015.

SAH, P.; FABER, E. S. Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Prog Neurobiol*, v. 66, n. 5, p. 345-353, 2002.

SALVEMINI, D. et al. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 90, n. 15, p. 7240-7244, 1993.

SANCHEZ, M. et al. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, v. 24, n. 1, p. 75-84, 2006.

SANDHIYA, S.; DKHAR, S. A. Potassium channels in health, disease & development of channel modulators. *Indian J Med Res*, v. 129, n. 3, p. 223-232, 2009.

SAYA, H. [Redox regulation in cancer stem cells]. *Nihon Rinsho*, v. 73, n. 5, p. 790-802, 2015.

SCHLEICHER, M. et al. The Akt1-eNOS axis illustrates the specificity of kinase-substrate relationships in vivo. *Sci Signal*, v. 2, n. 82, p. ra41, 2009.

SEOK, Y. M. et al. Enhanced Ca^{2+} -dependent activation of phosphoinositide 3-kinase class II α isoform-Rho axis in blood

vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, v. 56, n. 5, p. 934-941, 2010.

SHI, J. et al. Mechanism of magnesium activation of calcium-activated potassium channels. *Nature*, v. 418, n. 6900, p. 876-880, 2002.

SOUZA-MOREIRA, T. M. et al. Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, Myrtaceae, leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, p. 48-53, 2010.

STEIN, R. C.; WATERFIELD, M. D. PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Mol Med Today*, v. 6, n. 9, p. 347-357, 2000.

SUGAMURA, K.; KEANEY, J. J. F. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 51, n. 5, p. 978-992, 2011.

SZABO, C.; ISCHIROPOULOS, H.; RADL, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, v. 6, n. 8, p. 662-680, 2007.

THORPE, L. M.; YUZUGULLU, H.; ZHAO, J. J. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer*, v. 15, n. 1, p. 7-24, 2015.

TIAN, C. et al. Potassium channels: structures, diseases, and modulators. *Chem Biol Drug Des*, v. 83, n. 1, p. 1-26, 2014.

TOUYZ, R. M.; BRIONES, A. M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens Res*, v. 34, n. 1, p. 5-14, 2011.

VAN DE VOORDE, J.; LEUSEN, I. Role of the endothelium in the vasodilator response of rat thoracic aorta to histamine. *Eur J Pharmacol*, v. 87, n. 1, p. 113-120, 1983.

VAN DER ZYPP, A.; MAJEWSKI, H. Effect of cGMP inhibitors on the actions of nitrodilators in rat aorta. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 25, n. 1, p. 38-43, 1998.

VIARD, P. et al. PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. *Nat Neurosci*, v. 7, n. 9, p. 939-946, 2004.

VITOR, R. F. et al. Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *J Ethnopharmacol*, v. 93, n. 2-3, p. 363-370, 2004.

WAGNER, J. A. et al. Germinação e desenvolvimento inicial de duas espécies de jaboticabeira em função do tamanho de sementes *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 33, n. 1, p. 105-109, 2011.

WALLERATH, T. et al. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, v. 106, n. 13, p. 1652-1658, 2002.

WANG, W. H.; TYAN, Y. C. Evaluation of the antioxidant activity and antiproliferative effect of the jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) seed extracts in oral carcinoma cells. v. 2014, p. 1-7, 2014.

WANG, Y. et al. Class II phosphoinositide 3-kinase alpha-isoform regulates Rho, myosin phosphatase and contraction in vascular smooth muscle. *Biochem J*, v. 394, n. Pt 3, p. 581-592, 2006.

WEIDINGER, A.; KOZLOV, A. V. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules*, v. 5, n. 2, p. 472-484, 2015.

WULFF, H.; CASTLE, N. A.; PARDO, L. A. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, v. 8, n. 12, p. 982-1001, 2009.

YAM, C. H.; FUNG, T. K.; POON, R. Y. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci*, v. 59, n. 8, p. 1317-1326, 2002.

YANG, HEE W. et al. Cooperative Activation of PI3K by Ras and Rho Family Small GTPases. *Molecular Cell*, v. 47, n. 2, p. 281-290, 2012.

YOSHIOKA, K. et al. Essential role for class II phosphoinositide 3-kinase alpha-isoform in Ca²⁺-induced, Rho- and Rho kinase-dependent

regulation of myosin phosphatase and contraction in isolated vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, v. 71, n. 3, p. 912-920, 2007.

YU, H.; LITTLEWOOD, T.; BENNETT, M. Akt isoforms in vascular disease. *Vascular Pharmacology*, v. 71, p. 57-64, 2015.

ZANG, M. et al. Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes*, v. 55, n. 8, p. 2180-2191, 2006.

ZGHEEL, F. et al. Redox-sensitive induction of Src/PI3-kinase/Akt and MAPKs pathways activate eNOS in response to EPA:DHA 6:1. *PLoS One*, v. 9, n. 8, p. e105102, 2014.

ZICHA, J. et al. The interaction of calcium entry and calcium sensitization in the control of vascular tone and blood pressure of normotensive and hypertensive rats. *Physiol Res*, v. 63 Suppl 1, p. S19-27, 2014.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 12, n. 1, p. 21-35, 2011.

APÊNDICE A

Extrato	E _{max}	CE ₅₀ (µg/ml)
EBM-1	104,7% (91,5-117,8)	11,2 (6,5-15,9)
	94,8% (86,4-103,2)	9,0 (4,3-22,3)
	87,8% (74,4-99,3)	10,5 (3,5-17,5)

ANEXO A

Procedimento de extração assistida por micro-ondas, conteúdo de compostos fenólicos totais e rendimento de extração.

Extrato	Solução Extratora	Compostos fenólicos totais (mg/ml)	Rendimento (mg/ml)	Rota-Evaporado
EBM-1 ^a	Etanol 50%	4,889	62,3	Sim
EBM-2 ^a	Etanol 50%	4,889	63,13	Não
EBM-3 ^a	Água pH 3,6	2,54	43,8	Não

EBM^a- extrato bruto obtido por micro-ondas

ANEXO B

Procedimento de extração assistida por ultrapressão, conteúdo de compostos fenólicos totais e rendimento de extração.

Extrato	Solução Extratora	Tempo (horas)	Compostos fenólicos totais (mg/ml)	Rendimento (mg/ml)
EBHUP-1 ^a	Etanol 50%	1	7,32	54,10
EBHUP-2 ^a	Etanol 90%	1	5,40	46,50
EBHUP-3 ^a	Etanol 50%	3	7,26	63,50

EBHUP^a Extrato bruto hidroalcoólico obtido por ultrapressão

ANEXO C

Procedimento de extração assistida por ultrassom, conteúdo de compostos fenólicos totais e rendimento de extração.

Extrato	Solução Extratora	Tempo (minutos)	Compostos fenólicos totais (mg/ml)	Rendimento (mg/ml)
EBHUS-1 ^a	Etanol 50%	1	2,52	42,90
EBHUS-2 ^a	Etanol 50%	4	3,13	48,40
EBHUS ^a extrato bruto hidroalcoólico obtido por ultrassom				